

Biochemisch-taxonomische Untersuchungen an der Gattung *Cellulomonas*

Erko Stackebrandt

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551925_0059

Biochemisch-taxonomische Untersuchungen an der

Gattung Cellulomonas

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Erko Stackebrandt
aus
Hamburg

Mai 1974



1. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. K.H. Schleifer

Tag der Einreichung der Arbeit: 10.5.74

Tag der mündlichen Prüfung: 19.6.74

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	10
1.	Organismen	10
2.	Nährmedien	11
2.1.	Hefe-Dextrose-Medium	11
2.2.	Hefe-Gluconat-Medium	12
2.3.	Grundmedium zur Bestimmung des Zucker- spektrums	12
2.4.	Grundmedium zur Bestimmung der verwert- baren Säuren	12
2.5.	Nitrat-Medium	12
2.6.	MRS-Medium	12
2.7.	Cellulose-Medium	13
2.8.	Gelatine-Medium	13
3.	Kulturbedingungen und Anzucht	13
4.	Herstellung von Zellwänden	14
5.	Photographie	14
6.	Bestimmung der physiologischen Eigen- schaften	14
6.1.	Nitritbildung	14
6.2.	NH_3 -Freisetzung aus Pepton	15
6.3.	Gelatineverflüssigung	15
6.4.	Cellulosehydrolyse	15
6.5.	Zucker- und Säurespektrum	15
7.	Herstellung von Rohextrakten für den Nachweis der Enzyme des Entner-Doudoroff- Weges und der Fructose-6-P-Phosphoketolase	16
8.	Radiochemikalien	17

II

9.	Vergärung durch ruhende Kulturen im Puffer	17
9.1.	Manometrie	17
9.2.	Kurzzeitfütterung von Glucose	18
10.	Trennung der Gärprodukte	19
10.1.	Aufarbeitung der löslichen Fraktion	
10.2.	Zellextraktion	20
11.	Trennung und Identifizierung der Produkte	20
11.1.	Papierchromatographie	20
11.2.	Dünnschichtchromatographie	21
11.3.	Säulenchromatographie	22
11.4.	Enzymatische Bestimmungsmethoden	23
11.4.1.	Milchsäure	23
11.4.2.	Essigsäure	23
11.4.3.	Glucose	23
11.4.4.	Bestimmung der Konfiguration von Serin	23
12.	Proteinbestimmung nach Folin-Ciocalteus	24
13.	Dephosphorylierung der Zuckerphosphate und Isolierung der Glucose	24
14.	Abbau der Gärprodukte	24
14.1.	Decarboxylierung des Lactats	25
14.2.	Decarboxylierung des Alanins	25
14.3.	Totaloxydation und Decarboxylierung des Acetats	26
14.3.1.	Totaloxydation	26
14.3.2.	Decarboxylierung	26
15.	Messung der Radioaktivität	27
III.	Ergebnisse	28
1.	Vergleich der zur Artabgrenzung verwende- ten physiologischen Eigenschaften	28
1.1.	Morphologie	28

1.2.	Gramfärbung	36
1.3.	Zellwand	37
1.3.1.	Peptidoglycan	37
1.3.2.	Zellwandzucker	39
1.4.	Beweglichkeit	39
1.5.	Nitratreduktion	39
1.6.	NH ₃ -Bildung aus Pepton	40
1.7.	Cellulosehydrolyse	40
1.8.	Gelatineverflüssigung	40
1.9.	Zuckerverwertung	40
1.10.	Säureverwertung	40
2.	Säurebildung	41
2.1.	Bildung von Acetat und L-Lactat aus Glucose im HD-Medium	42
2.2.	Bildung von Acetat und L-Lactat bei der Glucosevergärung im Puffer	45
2.3.	Abhängigkeit der Säurebildung vom pH-Wert des Puffers	47
3.	Bestimmung der Abbauewege für Glucose	50
3.1.	Radiorespirometrie	50
3.1.1.	Radiorespirometrie unter aeroben Bedingungen	51
3.1.2.	Radiorespirometrie unter anaeroben Bedingungen	54
3.2.	Verteilung der Markierung auf die End- produkte bei Vergärung positionsmarkier- ter Glucose	56
3.3.	Bestimmung der Markierungsverteilung in den Endprodukten	60
3.3.1.	Markierungsverteilung im Acetat und Äthanol	60
3.3.2.	Markierungsverteilung im Lactat	60
3.4.	Bildung markierten Acetats aus 3,4- ¹⁴ C-Glucose	62

3.5.	Überlegungen, auf welchem Weg markiertes Acetat aus 3,4- ¹⁴ C-Glucose entstehen kann	66
3.5.1.	Bildung von markiertem Acetat im Verlauf des Glucoseabbaues	67
3.5.1.1.	6-P-Gluconatweg	68
3.5.1.2.	Entner-Doudoroff-Weg	68
3.5.1.3.	Bifidoweg	70
3.5.2.	Bildung von Acetat durch Refixierung von C ₁ -Stücken	71
3.5.2.1.	Einfluß von unmarkiertem Formiat und Bicarbonat auf die Bildung von Acetat und dessen intramolekulare Markierungsverteilung bei Vergärung von 3,4- ¹⁴ C-Glucose	73
3.5.2.2.	Einfluß von markiertem Formiat und Bicarbonat auf die Bildung von Acetat bei Vergärung von unmarkierter Glucose	77
3.5.3.	Umbau der Zuckerphosphate	81
3.5.3.1.	Bestimmung der Markierungsverteilung in der Glucose und in Gärprodukten	84
3.5.3.2.	Mechanismen der Kohlenstoffverschiebungen in Hexosen	91
IV.	Schlußbetrachtung	100
V.	Zusammenfassung	110
VI.	Literaturverzeichnis	112

Abkürzungen

DHA	=	Dihydroxyaceton
DHAP	=	Dihydroxyacetonphosphat
ED-Weg	=	Entner-Doudoroff-Weg
EMP-Weg	=	Emden-Meyerhof-Weg
FDP	=	Fructose-1,6-diphosphat
GAP	=	Glycerinaldehydphosphat
HMP-Weg	=	Hexose-Monophosphat-Weg
TCC	=	Tricarbonsäurecyclus

I. Einleitung

Die Vermutung, daß die Zerstörung von Cellulose und ihre Umwandlung in Humusstoffe, auf der Einwirkung von Mikroorganismen beruht, wurde zuerst von Mitscherlich (1850) geäußert. Diese Hypothese konnte durch Versuche von Popoff (1875) erhärtet werden, in denen eine Unterdrückung der Cellulosezerstörung durch Zugabe spezifischer Hemmstoffe für Mikroorganismen erreicht wurde. Im Rahmen der gleichen Untersuchung wurde die Bildung von Methan, Kohlendioxyd und Wasserstoff bei der Zerstörung von Cellulose beobachtet.

Ausführliche Untersuchungen wurden ab 1894 von Omelianski durchgeführt. Er isolierte zwei anaerob lebende, cellulosezerstörende Stämme, die sich in der Art der freiwerdenden Gase unterschieden: Die eine Kultur bildete CO_2 und H_2 , die andere Methan und CO_2 . Eine Reinisolierung der Stämme gelang Omelianski jedoch nicht. Van Iterson folgte aus den Ergebnissen seiner Arbeiten (1904), daß nicht nur anaerobe, sondern

auch aerobe lebende Organismen an der Celluloseverwertung beteiligt sind. Er unterteilte die cellulolytisch aktiven Bakterien in drei Gruppen : 1. Bakterien, die ohne Nitrat unter anaeroben Bedingungen eine echte Gärung durchführen, 2. Bakterien, die unter den gleichen Bedingungen, jedoch in Gegenwart von Nitrat, N_2 und CO_2 freisetzen, und 3. Bakterien die aerob, in leicht alkalischem Medium, Cellulose verwerten.

Mit Hilfe neuer, speziell für celluloseverwertende Organismen ausgearbeiteter Techniken, wurden von Kellermann und McBeth (1912) aus den beiden Kulturen von Omelianski verschiedene Organismen isoliert. Aus der Kultur, die Wasserstoff entwickelte, konnten sie 2 Celluloseverwerter und 5 Verunreinigungen, aus der zweiten Kultur, die Methan freigesetzt hatte, 1 Celluloseverwerter und 2 Verunreinigungen isolieren. Für die Gasentwicklung waren allein die Stämme, die sich als Verunreinigungen in den Kulturen befanden, nicht jedoch die Celluloseverwerter verantwortlich. Diese Stämme waren nur unter aeroben Bedingungen in der Lage, Cellulose zu hydrolysieren.

Kellermann und McBeth nannten diese Organismen *Bacillus flavigena*, *Bacillus amylolyticus* und *Bacillus rossica*.

1913 legten Kellermann, McBeth, Scales und Smith eine Liste von 13 cellulosezersetzenden Stämmen vor, die aus dem Boden und aus Pflanzenresten isoliert worden waren. Die allgemeine Beschreibung dieser Organismen lautete :

Gekrümmte, "coryneforme" Stäbchen, keine Kapseln, Gram negativ, aerob bis fakultativ anaerob, zum Teil beweglich. Säurebildung aus diversen Kohlenhydraten.

Die Verfasser stellten die Stämme in die Familie Bacteriaceae, Cohn, 1872.

In der 1. Ausgabe von Bergey's Manual (1923) wurden 31 Stämme von Bergey und Mitarbeitern in der Gattung *Cellulomonas*, Bergey et al. 1923 zusammengeschlossen. Die Gruppe war jedoch weniger gut definiert wie die von Kellermann et al. (1913) und durch die Anwesenheit Gram positiver und Gram negativer Stämme, sowie Sporenbildner und Nicht-Sporenbildner außerordentlich heterogen.

In dem Bemühen, die große Gruppe coryneformer, saprophytisch lebender Bodenbakterien und pflanzenpathogener Bakterien zu charakterisieren, wurde im Laufe der nächsten Jahrzehnte die Gattung *Corynebacterium*, Lehmann und Neumann, 1896, als ein Sammelbecken nicht eindeutig zu definierender Stämme benutzt. (Kisskalt und Behrend, 1918; Jensen, 1934; Krasilnikov, 1934; Orskov, 1938 und Lochhead, 1940). Die Ausdehnung dieser Gattung ging soweit, daß Conn (1947) schrieb: "... if all these forms are included, there is no reason for excluding any gram positiv nonsporeforming rods, exept the *Lactobacilli*." Ähnlich unzufrieden äußerten sich Conn und Dimmick, 1947, Cowan, 1950 und Jensen, 1952.

Die Eingliederung saprophytisch lebender coryneformer Bodenbakterien in die Gattung *Corynebacterium* betraf auch Vertreter der Gattung *Cellulomonas*. Jensen (1934) transferierte *C. fimi* (Scales and McBeth) Bergey et al. in diese Gattung. Daß es nur bei einem Vertreter der Gattung *Cellulomonas* blieb, lag an dem Fehlen weiterer *Cellulomonas*-Stämme in der Sammlung von Jensen.

Murray (1948) griff den Vorschlag von Jensen auf, so daß in der 6. Auflage von Bergey's Manual (1948) 1 coryneformer, aerober Celluloseverwerter in die Gattung *Corynebacterium*, alle anderen in die Gattung *Cellulomonas*, Familie *Bacteriaceae*, eingeordnet wurden.

Die Frage nach der Gattungszugehörigkeit der *Cellulomonas*-Stämme wurde von Clark (1951) erneut aufgeworfen. Er unter-

suchte eine Anzahl dieser Stämme und konnte keinen derartig gravierenden Unterschied zu *Corynebacterium fimi* feststellen, der eine Trennung dieser Organismen berechtigt hätte. Die Schwierigkeit lag für ihn vielmehr darin, ob man diese Organismen in die Gattung *Corynebacterium* übernehmen, oder zu einer eigenen Gattung, innerhalb der Familie *Corynebacteriaceae*, zusammenfassen sollte.

Ein wesentliches Merkmal, in dem sich die *Cellulomonas*-stämme von anderen coryneformen Stämmen unterscheiden, ist die Fähigkeit Cellulose zu hydrolysieren. In anderen Merkmalen, wie Form, Kohlenhydrat- und Stickstoff-Stoffwechsel und Beweglichkeit ist der Unterschied nicht so groß. Da jedoch der Besitz cellulolytisch aktiver Enzyme zur Gattungsunterscheidung nicht ausreicht (Clark, 1952), wurde die Vereinigung der Gattungen *Cellulomonas* und *Arthrobacter*, Conn und Dimmick, diskutiert. Innerhalb beider Gattungen findet man aerob bis mikroaerophil lebende Vertreter, die aus Glucose Säure bilden können und einen mehr oder wenig deutlichen Formenwechsel besitzen. Da sich jedoch die *Cellulomonas*stämme neben der Celluloseverwertung auch in einer wesentlich deutlicheren Säurebildung, in der Unfähigkeit, Harnsäure und Harnstoff zu hydrolysieren und in einem schwächer ausgeprägten Formenwechsel von der Gattung *Arthrobacter* unterscheiden, wurde von Clark (1952) vorgeschlagen, die Gattungen *Arthrobacter* und *Cellulomonas* als selbständige Gattungen beizubehalten. Eine Vereinigung mit der Gattung *Corynebacterium* kam nicht in Frage, da in dieser nur die aerob lebenden, unbeweglichen menschen- und tierpathogenen bzw. parasitischen Organismen mit coryneformer Morphologie enthalten sein sollten.

In Bergey's Manual, 7.Auflage, 1957, ist die Gattung *Cellulomonas*, in die auch wieder "*Corynebacterium*" *fimi* eingereiht wurde, zusammen mit den Gattungen *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Listeria* und *Erysepelothrix* in der Familie *Corynebacteriaceae* zusammengeschlossen.

Nach wie vor wurde jedoch von Schwierigkeiten berichtet, die bei taxonomischen Untersuchungen innerhalb der Gruppe coryneformer Organismen auftauchten (Jensen, 1966; Veldkamp, 1970). Differenzierungsmerkmale, wie Morphologie, physiologische Eigenschaften, Pathogenität bzw. parasitisches Verhalten, die zur Abgrenzung der Gattungen verwendet wurden, erwiesen sich oft als subjektiv und unsicher. Eine klare und eindeutige Trennung der Gattungen konnte nicht erreicht werden.

Eine Reihe von Untersuchungen wurden mit Hilfe der numerischen Methode ausgeführt. Aber die Anzahl der bei diesen Untersuchungen getesteten *Cellulomonas*-Stämme war nur sehr gering. N. Da Silva und Holt (1965) untersuchten nur *C. biazotea* ATCC 486 und *C. fimi* ATCC 484. Mit über 90 % Ähnlichkeit in den Merkmalen untereinander wurden sie eindeutig von den anderen untersuchten coryneformen Organismen abgetrennt und als separate Gruppe betrachtet.

Davis und Newton (1969) bezogen auch nur 2 Stämme der Gattung *Cellulomonas*, *C. biazotea* NCIB 8077 und *C. flavigena* NCIB 8909 in ihre Untersuchungen ein. Da diese jedoch nur 50 % Ähnlichkeit besaßen, wurden sie getrennt. Während *C. biazotea* zusammen mit *Arthrobacter terregens* NCIB 8909, *Corynebacterium michiganense* und 2 Stämmen von *Microbacterium lacticum* (75 % Ähnlichkeit) in eine Gruppe zusammengefaßt wurden, befand sich *C. flavigena* mit *Brevibacterium ammoniagenes* (75 % Ähnlichkeit) in einer Gruppe.

Auch Stuart und Pease (1972) untersuchten mit *C. biazotea* ATCC 486 und *C. flavigena* ATCC 482 nur 2 *Cellulomonas*-Stämme und faßten diese auf Grund der hohen Ähnlichkeit von 96 % in einer Gruppe zusammen. Bousfield (1972) untersuchte nur einen Stamm, *C. biazotea* NCIB 8077, und stellte diesen zusammen mit *Nocardia cellulans* NCIB 8868, *Brevibacterium fermentans* NCIB 9943 und *Corynebacterium manihot* NCIB 9097 (60 % Ähnlichkeit) in eine Gruppe.

Bei neueren numerischen Untersuchungen durch Seiler (1974) an einer größeren Anzahl von Stämmen, ergab sich eine enge Beziehung zwischen *C. biazotea* ATCC 486, *C. cellasea* NCIB 8078, *C. flavigena* ATCC 482, *C. gelida* ATCC 488 und *C. subalbus* NCIB 8075. Lediglich *C. cartalyticum* ATCC 21681 befand sich außerhalb dieser Gruppe und wurde in die Nähe von *Corynebacterium manihot* NCIB 9097 und *C. aquaticum* ATCC 14665 gestellt.

Über die Aussagekraft der numerischen Methode herrscht jedoch geteilte Meinung. So kritisierten Yamada und Komagata (1972b) an dieser Methode, daß das Prinzip der Gleichwertigkeit aller untersuchten Merkmale nicht zum Ziel einer eindeutigen Klassifizierung führen kann. Auch wir sind der Meinung, daß Merkmale, die polygen bedingt sind, wie z.B. der Zellwandtyp, stärker gewichtet werden müßten als monogen bedingte Merkmale.

Auch die Berechtigung einer eigenen Gattung *Cellulomonas* und die damit verbundene Abgrenzung gegen andere Gattungen war Gegenstand von Diskussionen. N. Da Silva und Holt (1965) folgerten, daß die Fähigkeit, Cellulose zu hydrolysieren, eng mit anderen Merkmalen korreliert sein muß. Sie, sowie Yamada und Komagata (1972b) betonten die Eigenständigkeit der Gattung *Cellulomonas*, was von Jensen (1966) jedoch angezweifelt wurde. Neben einer zu geringen Anzahl untersuchter *Cellulomonas*-stämmen scheiterte eine sichere Abtrennung der Gattung bisher am Fehlen gründlich untersuchter biochemischer Merkmale wie z.B. der Guanin-Cytosin-Gehalt der DNS, die Zusammensetzung der Zellwand, das Verhältnis zum Sauerstoff, Enzymmuster, Pathogenität (Cowan, 1970) und der Abbauweg für Glucose.

Es liegen jedoch bisher, mit einigen Ausnahmen, nur unvollständige Ergebnisse von Arbeiten auf diesen Gebieten an coryneformen Organismen vor. Diese Ausnahmen sind die Untersuchungen von Yamada und Komagata (1970, 1972 a,b) über morphologische, biochemische und physiologische Merkmale und die von Fiedler und Kandler (1973) über die Zellwand.

Bei coryneformen Organismen reicht die Spanne des GC-Gehaltes der DNS von 45-78 %, wobei innerhalb der meisten Gattungen die Werte breit gestreut sind. Dagegen ist die Gattung *Cellulomonas* durch einen sehr engen Bereich von 71-73 % ausgezeichnet (Yamada und Komagata, 1970).

Ähnlich auffällig ist das Ergebnis der Zellwandanalysen. Die coryneformen Organismen zeigen die größte Variation im Peptidoglycan von allen Bakterienfamilien. Von den bisher gefundenen 28 Typen entfallen etwa die Hälfte auf Vertreter aus der Familie *Corynebacteriaceae* (Schleifer und Kandler, 1972). Während innerhalb der meisten Gattungen mehrere Variationen vertreten sind, herrscht in der Gattung *Cellulomonas* ein Typ vor (Fiedler und Kandler, 1972), der innerhalb der Familie sonst nicht mehr gefunden wird.

Als weiteres wichtiges Merkmal, das häufig zur Differenzierung herangezogen wird, gilt der Abbauweg für Glucose. Diese Untersuchungen sind bei coryneformen Organismen jedoch nur in wenigen Fällen gemacht worden.

Morris (1960) fand bei *Arthrobacter globiformis*, daß Glucose zu 65 % über den Emden-Meyerhof-Weg (EMP-Weg) und zu 35 % über den Hexosemonophosphatweg (HMP-Weg) zu Pyruvat abgebaut wird. Ähnliche Ergebnisse wurden von Ghiretti und Barron (1954) bei *A. creatinovorans* und von Zagallo und Wang (1961) bei *A. ureafaciens* gefunden. Dagegen sollte nach Meinung der beiden letztgenannten bei 3 weiteren *Arthrobacter*-stämmen die Glucose über den Entner-Doudoroff-Weg (ED-Weg) und den HMP-Weg zerlegt werden. Die Beteiligung des ED-Weges konnte jedoch aus eigenen Arbeiten nicht bestätigt werden (Stackebrandt, 1971). Der Abbau der Glucose erfolgte auch bei diesen Stämmen über den EMP- und den HMP-Weg.

Auch die Untersuchungen an *Corynebacterium diptheriae* (Hulanicka, 1960) bewiesen die Beteiligung des HMP-Weges am Abbau der Glucose. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen von Zagallo und Wang (1967), die bei 5 Stämmen der

Gattung *Corynebacterium* den HMP-Weg und die Glycolyse nachweisen konnten. Die Beteiligung des ED-Weges innerhalb dieser Gattung konnten von Kersters und De Ley (1968a) durch Enzymuntersuchungen ausgeschlossen werden.

Der weitere Abbau des Pyruvats erfolgt bei allen bisher untersuchten aeroben Stämmen über den Zitronensäurecyclus (Zajik et al. 1956; Fukun und Vandermark, 1952; Kornberg, 1956; Morris, 1960). *Microbacterium lacticum* baut unter aeroben Bedingungen Glucose über den 6-P-Gluconatweg, unter anaeroben Bedingungen dagegen über den EMP- und HMP-Weg ab (Vandemark und Wood, 1956). Über den Abbaupfad der Glucose innerhalb der Gattung *Cellulomonas* liegen keine Ergebnisse vor.

Säurebildner sind in allen Gattungen der Familie *Corynebacteriaceae* vertreten. Während zur Säurebildung in den Gattungen *Corynebacterium* und *Arthrobacter* jedoch nur einige Stämme befähigt sind, wurde die signifikante Säurebildung der *Cellulomonas*-Stämme unter aeroben Bedingungen schon früh (Kellermann und McBeth, 1912) als Differenzierungsmerkmal verwendet. Über die Art der gebildeten Säuren liegen bei den coryneformen Organismen jedoch bisher nur ungenügende Ergebnisse vor. Eine gründliche Bilanz wurde bisher nur von Moore und Cato an *Corynebacterium acne* (1963) und von Vandemark (1956) an *Microbacterium lacticum* aufgestellt. *C. acne* produziert anaerob aus Glucose Formiat, Acetat, Lactat, Propionat und Succinat. *Microbacterium lacticum* bildet unter anaeroben Bedingungen L-Lactat, aerob dagegen L-Lactat und Acetat.

Aus eigenen Arbeiten (1971) ging hervor, daß eine Reihe von Organismen aus den Gattungen *Arthrobacter* und *Corynebacterium*, und alle untersuchten Stämme der Gattung *Cellulomonas*, zur Bildung von L-Lactat befähigt sind.

Um zu einer sicheren Abtrennung der Gattung *Cellulomonas* von den anderen Gattungen der Familie *Corynebacteriaceae* zu gelangen und um nachzuweisen, daß Celluloseverwertung und Säurebildung nicht die einzigen gemeinsamen Merkmale sind, die die Stämme auszeichnen, müssen weitere intensive Untersuchungen über den Stoffwechsel und biochemische Eigenschaften angestellt werden. Die in Bergey's Manual aufgeführten Differenzierungsmerkmale, die sich auf Arbeiten von Cark (1951) stützen und sich auf Beweglichkeit, Nitratreduktion, Ammoniakbildung, Pentoseverwertung und Pigmentfarbe beziehen, erscheinen uns nicht ausreichend, um die Arten eindeutig zu unterscheiden.

Wir haben daher an allen zur Zeit verfügbaren Stämmen ergänzende Untersuchungen über die Zellwand und den Stoffwechsel, insbesondere über den Abbauweg der Glucose und die Säurebildung angestellt. Zum Vergleich mit den Angaben von Clark (1951) wurden die, auch von ihm verwendeten, physiologischen Eigenschaften überprüft.

II. Material und Methoden

1. Organismen

Die untersuchten Stämme und ihre Herkunft sind in Tab.1 zusammengefaßt.

Zu Vergleichszwecken wurden *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* Stamm H, *Microbacterium lacticum* Stamm Lechevalier 630, *Corynebacterium callunae* ATCC 15991 und *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 zu den Untersuchungen herangezogen.

Zum Abbau von Glucose wurde *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 12291 eingesetzt.

Tab.1: Untersuchungsmaterial und seine Herkunft

ATCC	American Type Culture Collection. Rockville Maryland, U.S.A.
NCIB	National Collection of Industrial Bacteria Aberdeen, Scotland
Lechevalier	Prof.Dr.M.P.Lechevalier, Rutgers University, New Brunswick, N.J. U.S.A.
Vaughn	Prof.Dr.R.H.Vaughn, University of California, U.S.A.

Gattung	Species	Herkunft	Stammbezeichnung
Cellulomonas	biazotea	Lechevalier	
	biazotea	ATCC	486
	cartalyticum	ATCC	21681
	cellasea	NCIB	8078
	fimi	ATCC	484
	fimi	ATCC	15724
	flavigena	ATCC	482
	flavigena	Vaughn	DS
	gelida	ATCC	488
	species	ATCC	21399
	subalbus	NCIB	8075
	uda	ATCC	491

Alle Stämme lagen in lyophilisierter Form vor. Cellulomonas flavigena DS erhielten wir von Prof. Vaughn, alle anderen Stämme waren im Besitz der Deutschen Kulturrensammlung, München.

2. Nährmedien

2.1. Hefe-Dextrose-Medium

Casein-Pepton, trypt. (Merck)	10 g
D-Glucose	5 g
Hefeextrakt, gepulvert (Merck)	5 g
Leitungswasser	1 l
pH 7.5	

2.2. Hefe-Gluconat-Medium

Anstelle der Glucose im HD-Medium wurden 5 g Na-Gluconat/11 Medium zugegeben.

2.3. Grundmedium zur Bestimmung des Zuckerspektrums

HD-Medium ohne Glucose wurde nach Einstellen des pH-Wertes auf 7.5 sterilisiert. Die Zucker bzw. Zuckeralkohole wurden als sterile Lösungen dem Grundmedium in einer Endkonzentration von 0.5 % zugegeben und anschließend im Dampftopf 15 min in strömendem Dampf erhitzt.

2.4. Grundmedium zur Bestimmung der verwertbaren Säuren

Anstelle der Glucose im HD-Medium wurden organische Säuren in einer Endkonzentration von 0.3 % zugegeben. L- und D-Lactat (Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg) wurden in einem Verhältnis L : D = 2 : 1 zusammen angeboten.

2.5 Nitrat-Medium

30 ml eines sterilen HD-Mediums wurden mit 4 ml einer sterilen 1.5 % KNO_3 -Lösung versetzt.

2.6. MRS-Medium (De Man et al. 1960)

(ohne Citrat und Acetat)

Pepton aus Casein, tryp. (Merck)	10 g
Hefeextrakt (Merck)	4 g
Fleischextrakt (Brunnengräber)	2 g
D-Glucose	20 g
Tween 80	1 ml
K_2HPO_4	2 g
KH_2PO_4	11 g
MgSO_4	200 mg
MnSO_4	50 mg
H_2O dest.	1 l
pH 6.5	

2.7. Cellulose-Medium

HD-Medium ohne Glucose wurde mit 3 % Filterpapierschnitzel (Whatman Nr. 1) von einer Größe 0.3×0.5 cm versetzt und sterilisiert.

2.8. Gelatine-Medium

Hefeextrakt (Merck)	5 g
D-Glucose	5 g
Gelatine (Merck)	140 g
Leitungswasser	1 l
pH 7.5	

Die Nährböden 1-7 wurden bei 120°C für 20 min sterilisiert. Nährboden 8 wurde durch fraktioniertes Erhitzen auf 100°C für 3×20 min sterilisiert.

Zur Herstellung fester Nährböden wurde zum Medium 1.8 % Agar (Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg) zugesetzt.

3. Kulturbedingungen und Anzucht

Alle Stämme, mit Ausnahme von *Leuconostoc mesenteroides*, wurden in HD-Medium bei 30°C aerob kultiviert.

Leuconostoc mesenteroides wurde mikroaerophil bei 32°C angezogen.

Die von den Kulturensammlungen erhaltenen, lyophilisierten Keime wurden steril in 30 ml HD-Medium überführt und bebrütet. Mit Hilfe des Plattenverdünnungsverfahrens und mikroskopischer Kontrolle wurden die Stämme auf Einheitlichkeit geprüft. War diese gewährleistet, so wurde von jedem Stamm eine Vorratskultur auf Schrägagar angelegt, die bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt wurde. Alle 12 Wochen wurden die Kulturen überimpft.

Für physiologische Versuche wurden die Bakterien aus der Stichkultur vor der Verwendung mindestens 3 mal in HD-Medium

weitergeführt. Zur Anzucht größerer Mengen wurden 300 ml HD-Medium in 1 l Erlenmeyerkolben mit 3 ml einer stark gewachsenen Vorkultur beimpft und 12-15 Std. bebrütet. Bei der Ernte der Zellen wurden die Kulturen im Phasenkontrastmikroskop und gegebenenfalls durch Ausstreichen auf Agarplatten auf Reinheit geprüft.

4. Herstellung von Zellwänden

Von den neuzugesandten Stämmen wurde die Aminosäurezusammensetzung der Zellwand nach der Methode von Schleifer und Kandler (1967) analysiert. Ebenfalls wurde von *Cellulomonas biazotea*, mit dem ständig gearbeitet wurde, zur Überprüfung der Identität alle 12 Monate eine Zellwandanalyse durchgeführt.

5. Photographie

1 ml Zellen in HD-Medium gewachsener Kulturen aus der logarithmischen (15 Std.) und spätstationären Phase (14 Tage) wurden in Eppendorf-Zentrifugengläschen zentrifugiert und mit 0.1 ml Phosphatpuffer pH 6.5 gewaschen. Der Rückstand wurde in 0.5 ml einer 0.5 %, wässrigen Agarlösung aufgenommen. Von dieser Suspension wurde 1 Tropfen auf einem Objektträger mit Hilfe des Deckgläschens verteilt.

Die Aufnahmen wurden im Phasenkontrast mit einem Leitz-Photomikroskop hergestellt.

6. Bestimmung der physiologischen Eigenschaften

6.1. Nitritbildung

Nitrit wurde nach den Angaben von Drews (1968) bestimmt. Nach einem Wachstum von 24 bzw. 48 Std. in nitrathaltigem Medium (2.5.) wurde Nitrit im Überstand mit dem Gries-Ilosvaye-Reagenz nachgewiesen :

Lösung A: 0.05 g Sulfanilsäure in 15 ml 5 N Essigsäure lösen

Lösung B: 0.1 g Naphthylamin in 20 ml kochendem Wasser lösen.

Überstand abgießen und mit 5 N Essigsäure auf 150 ml auffüllen.

Zu 2 ml Kulturflüssigkeit wurden 0.1 ml der Lösung A gegeben. Die Flüssigkeit wurde auf 75°C erhitzt und dann tropfenweise mit Lösung B versetzt. Bei Anwesenheit von Nitrit bildete sich ein roter Farbstoff, der bei starkem Nitritgehalt nach gelb umschlug.

6.2. NH₃-Freisetzung aus Pepton

Zum Nachweis der Ammoniakbildung aus Pepton wurde ein HD-Medium ohne Glucose verwendet. Nach 3-4 Tagen Wachstum wurde Ammoniak mit Hilfe von Neßlers Reagenz (Merck) im Überstand bestimmt. 1 Tropfen des Reagenz rief bei Anwesenheit von Ammoniak im Medium einen gelbbraunen Niederschlag hervor.

6.3. Gelatineverflüssigung

Die Kulturen wurden 2 Wochen lang bei 30°C in Medium 2.8. geschüttelt. Die Verflüssigung der Gelatine wurde nach Abkühlen des Mediums auf 4°C nachgewiesen.

6.4. Cellulosehydrolyse

Die Kulturen wurden 2 Tage im Cellulosemedium (2.7.) kultiviert. Nach dieser Zeit war das Papier nach positiver Hydrolyse völlig zerstört und zu einer breiigen Masse geworden. Als Kontrolle, daß die Zerstörung nicht auf einer mechanischen Zerreibung durch das Schütteln beruhte, wurde ein nicht-beimpftes Kölbchen mitgeführt.

6.5. Zucker- und Säurespektrum

Nach 1,2,3,4,8 und 21 Tagen wurde den auf Glucose gezogenen Kulturen ein Aliquot entnommen und die Dichte ($E = 578 \text{ nm}$) und der pH gemessen. Außerdem wurde enzymatisch die Menge des gebildeten L- und D-Lactats, sowie die des Acetats bestimmt. Bei Substraten, deren Verwertung zur Bildung von Säure führte, wurde L-Lactat und, bei manchen Zuckern, auch Acetat bestimmt.

Bei Substraten, bei denen man auf Grund fehlender Säurebildung eine Verwertung nicht sofort erkannte, wurde diese papierchromatographisch geprüft. Dabei wurde vom 1. und 8. Tag ein Aliquot des Überstandes, und als Kontrolle die gleiche Menge des unbeimpften Mediums aufgetragen. Eine Verwertung des Substrates zeigte sich nach dem Entwickeln in einer Verringerung der Fleckgröße der Proben, die während des Wachstums entnommen wurden, gegenüber der des unbeimpften Mediums.

7. Herstellung von Rohextrakten für den Nachweis der Enzyme des Entner-Doudoroff-Weges und der Fructose-6-P-Phosphoketolase.

Für den Nachweis der Enzyme des Entner-Doudoroff-Weges wurden *Cellulomonas biazotea* ATCC 486, *Cellulomonas flavigena* ATCC 482 und *E. coli* in Hefe-Gluconat-Medium (2.2.) gezüchtet und nach 16 Std. geerntet. *C.biazotea* ATCC 486, bei dem die Phosphoketolase nachgewiesen werden sollte, wurde in HD-Medium kultiviert.

Nach dem Waschen in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.5, der einen Zusatz von 4×10^{-3} M Mercaptoäthanol enthielt, wurden die Zellen der Stämme der Gattung *Cellulomonas* mit Hilfe von Glasperlen (0,17 - 0.19 mm) in einem Bühler Homogenisator unter Wasserkühlung zerschlagen. Die Zellen wurden auf einer Fritte (Gl) von den Glasperlen abgesaugt. Diese wurden zweimal mit Puffer nachgewaschen.

Zellen und Zellwände wurden 15 min bei 20000 U/min in einer Sorvall-Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der klare Überstand (= Rohextrakt) wurde auf die Anwesenheit der Enzyme des ED-Weges geprüft.

Die Zellen von *E. coli* wurden mit einem Sonifier aufgebrochen und der Überstand des Zentrifugats als Rohextrakt in den Test eingesetzt.

Die Durchführung des Tests für den Nachweis der Enzyme des Entner-Doudoroff-Weges wurde nach den Angaben von Kersters und De Ley (1968 b), die für den Nachweis der Phosphoketolase nach den Angaben von Schramm et al. (1958) ausgeführt.

8. Radiochemikalien

	<u>Spez. Aktivität:</u>	<u>Herkunft:</u>
Na-Bicarbonat- ^{14}C	60 mCi/mMol	Amersham
Na-Formiat- ^{14}C	59 mCi/mMol	Amersham
Glucose-1- ^{14}C	0.25 mCi/0.885 mg	NEN-Chem.
Glucose-2- ^{14}C	0.05 mCi/0.163 mg	NEN-Chem.
Glucose-3- ^{14}C	25 μCi /0.45 mg	NEN-Chem.
Glucose-3,4- ^{14}C	10 μCi /0.13 mg	NEN-Chem.
Glucose-6- ^{14}C	0.25 mCi/0.79 mg	NEN-Chem.
Na-Pyruvat-1- ^{14}C	0.05 mCi/0.7 mg	NEN-Chem.

9. Vergärungen durch ruhende Kulturen im Puffer

Die Zellen wurden durch Zentrifugieren geerntet (10 min bei 3000 U/min) und 2 mal mit 0.8 % NaCl-Lösung (10 min bei 12 000 U/min) gewaschen. Je nach Menge wurden die Zellen dann in 3-5 ml der Waschflüssigkeit aufgenommen, gut suspendiert und anschließend 1 Std. bei 30°C vorinkubiert.

9.1. Manometrie

Alle Versuche wurden bei 30°C und mittlerer Schüttelfrequenz in einem Warburgapparat (Braun, Melsungen) ausgeführt. Als Reaktionsgefäße dienten Kölbchen mit Seitenarm und Mitteleinsatz. Die Größe der verwendeten Gefäße richtete sich nach der Menge der zu verwertenden Glucose:

- Für den *Leuconostoc*-Abbau der Glucose (80 μM) und für die Versuche mit unmarkierter Glucose (250 bzw. 375 μM) wurden Gefäße mit ca. 70 ml Gesamtvolumen benutzt.
- Bei allen anderen Versuchen wurden 20 bzw. 25 μM Substrat angeboten. Diese Versuche wurden in Gefäßen mit ca. 14 ml Gesamtvolumen ausgeführt.

Die genauen Mengenangaben in den einzelnen Versuchen, sowie die Versuchsdauer, sind am Kopfteil der Tabellen im Ergebnisteil angeführt.

Als Puffer wurde in allen Fällen ein 0.1 M Phosphatpuffer (K_2HPO_4/KH_2PO_4) verwendet. Aerobe Versuche wurden mit einem Puffer pH 6.5, anaerobe Versuche mit einem Puffer pH 5.5 durchgeführt.

Zur Absorption des CO_2 wurde 5 % Kalilauge verwendet.

Zusammen mit radioaktiv markiertem Substrat wurde als Träger unmarkiertes Substrat aus dem Seitenarm beigegeben.

Bei anaeroben Versuchen wurden die Gefäße 10 min mit Stickstoff durchgespült.

Vor dem Kippen des Substrates fand eine zweite Vorinkubation statt, die solange durchgeführt wurde, bis sich unter aeroben Bedingungen am Manometer eine konstante Druckdifferenz eingestellt hatte.

Um CO_2 quantitativ als K_2CO_3 aufzufangen, wurde das CO_2 bei Versuchsende durch Zugabe von 1 ml 10 % H_2SO_4 aus dem Puffer ausgetrieben.

Nach Beendigung des Versuchs wurden die Gefäße gekühlt, die Bakteriensuspension gegen Phenolphthalein bis zum Umschlagpunkt titriert und dann zur weiteren Analyse entnommen.

Die KOH wurde aus dem Mitteleinsatz herauspipettiert und die Aktivität in unendlich dünner Schicht im Methandurchflußzähler bestimmt.

9.2. Kurzzeitfütterung von Glucose

Als Reaktionsgefäße dienten bei einem Gesamtvolumen von 200 μ l Zentrifugengläschen der Eppendorf-Tischzentrifuge und bei einem Gesamtvolumen von 400 μ l Sorvall-Pyrex Zentrifugengläschen. Der genaue Ansatz des Reaktionspuffers ist aus dem Kopfteil der Ergebnistabellen zu entnehmen. Während der gesamten Zeit von 10 min wurden die Gefäße bei 30°C mit Stickstoff durchgespült.

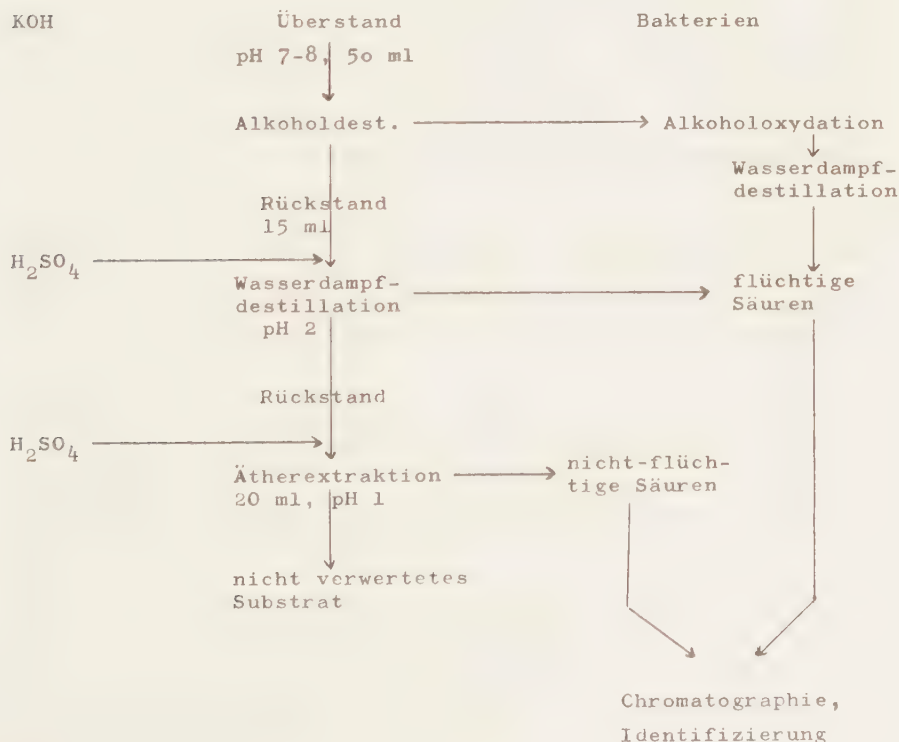
10. Trennung der Gärprodukte

10.1. Aufarbeitung der löslichen Fraktion

Aus dem Reaktionspuffer wurden die Bakterien abzentrifugiert und, bis auf die des Kurzzeitfütterungsversuches, zweimal mit H_2O dest. gewaschen. Anschließend folgte die Aktivitätsbestimmung in den Bakterien.

Das Überstehende wurde quantitativ in einem Spitzkolben gesammelt. Als Trägersubstanz wurde bei Versuchen mit markierten Substraten je 0.3 mMol unmarkiertes Acetat, Lactat, Formiat, Äthanol und 0.15 mMol Succinat hinzugefügt.

Die Gärungsprodukte wurden nach folgendem Schema aufgetrennt (nach Neish, 1952)



Vom neutralen Überstand, der außer CO_2 alle Gärprodukte enthielt, wurde $3/4$ des Volumens abdestilliert. Das Destillat wurde in einer verdünnten, chromatgesättigten Chromschwefelsäure aufgefangen und 45 min bei Zimmertemperatur oxidiert.

Die bei der Oxidation entstandenen homologen Säuren wurden mit Hilfe einer fraktionierten Wasserdampfdestillation gewonnen (Wiesenberg, 1948).

Der Rückstand der Alkoholdestillation wurde mit 1 ml 10 N H_2SO_4 angesäuert und fraktioniert destilliert. Die Destillation wurde solange durchgeführt, bis die Menge an Natronlauge verbraucht war, die zur Titration der vorgelegten Säuren notwendig war.

Der Rückstand der Destillation wurde mit 10 N H_2SO_4 auf pH 1 gebracht und einer kontinuierlichen Ätherextraktion unterworfen, die 36 Stunden durchgeführt wurde.

Die neutralisierten Säuren wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und in einem definierten Volumen H_2O dest. aufgenommen. Ein Aliquot wurde zur Aktivitätsbestimmung herangezogen.

10.2. Zellextraktion

Zellen, die zur Extraktion herangezogen wurden, wurden nicht gewaschen, sondern nach dem Abzentrifugieren so gut wie möglich vom Haftwasser befreit.

Die Extraktion erfolgte mit je 1 ml 70 %, 50 % und 20 % Alkohol, sowie mit H_2O dest. für 20 min bei 80°C . Die Fraktionen wurden zusammengegeben, eingedampft und zur Auftrennung und Identifizierung der markierten Produkte zweidimensional chromatographiert.

11. Trennung und Identifizierung der Produkte

11.1. Papierchromatographie

Alle Substanzen wurden auf Chromatographiepapier Whatman Nr. 1 ein- bzw. zweidimensional absteigend chromatographiert.

Identifizierung erfolgte entweder durch Vergleichschromatographie von authentischen Substanzen, oder, wie im Falle von Bernsteinsäure und Alanin, mit Hilfe der Cochromatographie.

Für Säuren wurden folgende Laufmittel angewendet :

I. Phenol 88 % : Wasser : Eisessig : 1 M EDTA =
840 : 160 : 10 : 1 (v/v)

II. n-Butanol : Wasser = 750 : 50 (v/v)
Propionsäure : Wasser = 352 : 448 (v/v)

Diese Lösungen wurden vor Gebrauch frisch im
Verhältnis 1 : 1 gemischt.

Als Nachweisreagenz diente Glucose/ Anilin (Schweppe, 1954)

Zucker wurden in folgendem Laufmittel chromatographiert:

III. Butanol : Pyridin : Eisessig : Wasser =
60 : 40 : 30 : 3

Als Nachweisreagenz diente Silbernitrat (Trevelyan et al.1950).

Alanin wurde in den Laufmitteln

IV. Isopropanol : Eisessig : Wasser = 75 : 10 : 15 und
V. α -Picolin : Wasser : Ammoniak = 70 : 28 : 2

zweidimensional chromatographiert und identifiziert. Als
Nachweisreagenz diente Nynhydrin (Dörfel, 1959).

11.2. Dünnschichtchromatographie

Pyruvat wurde nach der Methode von Wieland (1949), verändert
von Kersters und De Ley (1968 a), nachgewiesen.

Reagentien:

Dünnschicht-Chromatographieplatte, Zellulose, 0.3 mm
Machery und Nagel, Düren.

Laufmittel : n-Propanol : Ammoniak : Wasser = 6 : 3 : 1

Sprühreagenz: äquimolekulare Mischung aus :
0.2 % äthanolische o-phenylendiamin Lösung und
20 % wässriger Trichloressigsäure.

Ausführung:

Die pyruvathaltige Substanz wurde nach dem Auftragen 2-3 Std. bei Raumtemperatur entwickelt, 30 min getrocknet und besprüht. Trockenzeit: 2-3 min bei 105°C. Unter UV-Licht fluoreszierte Pyruvat gelb-grün. Der Rf-Wert lag bei 0.63 bis 0.67.

11.3 Säulenchromatographie (Varner, 1957).

8 g wasserfreies Kieselgel (Mallinckrodt p.a. 100 mesh) wurden mit 4.65 ml 0.01 N HCl vermischt und in 50 ml wassergesättigtem Chloroform suspendiert. Diese Suspension wurde unter leichtem Druck in eine Säule (Länge 20 cm, Durchmesser 1 cm) gepreßt. Auf die Säule wurde 1 g wasserfreies Kieselgel in wasserfreies Chloroform eingerührt und darauf, zur Entsalzung der neutralisierten Säuren, 0.5 g Dowex H⁺ gepreßt. Die Salze der zu trennenden Säuren wurden in max. 0.8 ml aqua dest. aufgenommen und in die oberste Kieselgelschicht eingedrückt.

a) Trennung der wasserdampfvlüchtigen Säuren:

Eluationsmittel für Acetat: Chloroform : Butanol = 97.5 : 2.5

Eluationsmittel für Formiat: Chloroform : Butanol = 92.5 : 7.5

Das Chloroform der Laufmittel war wassergesättigt.

Die Säuren wurden mit 400 Tr/Fraktion gesammelt. Durch Titration jeder Fraktion mit 0.1 N NaOH gegen Phenolphthalein konnte die Lage der Peaks festgestellt und eine Mengenbestimmung der Säuren durchgeführt werden. Ergaben die Titrationswerte, daß Acetat quantitativ von der Säule eluiert worden war, so wurde das Laufmittel für Formiat an die Säule angeschlossen.

b) Trennung der ätherextrahierbaren Säuren:

Milchsäure und Bernsteinsäure wurden mit

Benzol : Butanol = 80 : 20 mit 90 Tr/Fraktion voneinander getrennt.

Wurde die Säule dazu benutzt, um eine unbekannte, markierte

Säure zu identifizieren, so wurde aus jeder Fraktion des Peaks ein Aliquot zur Aktivitätsbestimmung herangezogen. Diente die Säule dagegen ausschließlich zur Trennung von bekannten Säuren, so wurden alle Fraktionen eines Peaks vereinigt und die Salze am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt.

11.4. Enzymatische Bestimmungsmethoden

11.4.1. Milchsäure:

Die Milchsäurebestimmung erfolgte nach der Methode von Hohorst, 1962.

Zur Bestimmung von L-Milchsäure wurde die L-Lactatdehydrogenase (Boehringer, Mannheim, Kaninchenmuskel, Kristallsuspension 5 mg Protein/ml) benutzt.

D-Milchsäure wurde mit Hilfe der D-Lactatdehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides* (Ammonsulfatfällung 45-60 %) bestimmt.

11.4.2. Essigsäure:

Essigsäure wurde nach der Methode von Rose, 1955, als Acet-hydroxamat, bestimmt.

11.4.3. Glucose:

Glucose wurde nach den Angaben von Bergmeyer (1962), modifiziert für Halbmikroküvetten (Dr.M.Senser, pers.Mitteilg.) bestimmt.

11.4.4. Bestimmung der Konfiguration von Serin (Larson et al. 1971)

Die Bestimmung der Konfiguration erfolgte mit Hilfe des Aminosäureanalysators an Parallelproben von hydrolysierte Zellwand, die ohne und mit D-Aminosäureoxydase (Boehringer, Mannheim) behandelt worden waren.

12. Proteinbestimmung nach Folin-Ciocalteus (Lowry et al. 1951)

Zur Bestimmung des Proteingehaltes ganzer Zellen wurde 1 ml Bakteriensuspension in 2 ml einer 2 N NaOH-Lösung bei 70°C für 12 Std. inkubiert. Die Proteinmenge des Lysats wurde über eine Eichkurve (Rinderserumalbumin) bestimmt.

13. Dephosphorylierung der Zuckerphosphate und Isolierung der Glucose

Die auf dem Chromatogramm ermittelten Zuckerphosphate wurden mit wenig Wasser eluiert, unter leichtem Luftstrom zur Trockne eingeengt und mit 50 µl saurer Phosphatase (Boehringer, Mannheim) für 12 Std. bei 30°C inkubiert. Das Inkubationsgemisch wurde in Laufmittel III getrennt und die Flecke, die sich nach der Radioautographie auf der Höhe der Referenzglucose befanden, eluiert. Diese Substanz wurde nacheinander in Laufmittel I und zweimal in Laufmittel III laufen gelassen und befand sich in jedem Fall auf der Höhe der Referenzglucose.

14. Abbau der Gärprodukte

Der Abbau der Gärprodukte Lactat, Alanin, Acetat und Äthanol erfolgte nach den Methoden von Simon und Floss (1967).

Äthanol wurde zum Abbau zu Acetat oxidiert.

Alle Aktivitäten wurden als BaCO_3 in unendlich dicker Schicht gemessen.

Bei allen Abbauteilen wurde CO_2 durch zwei hintereinander geschaltete Fallen mit je 10 ml 0.1 N Ba(OH)_2 geleitet und als BaCO_3 gefällt. Das überschüssige Ba(OH)_2 wurde mit 0.1 N HCl gegen Phenolphthalein unter Stickstoff zurücktitriert. Das BaCO_3 wurde auf Porzellanfritten ($\varnothing$ 1 cm) abgesaugt, mit Wasser nachgewaschen und bei 100°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Vor jeder Zählung wurde das Gewicht bestimmt, um sicher zu sein daß die Messung in unendlich dicker Schicht ausgeführt wurde (mind. 20 mg BaCO_3).

14.1. Decarboxylierung des Lactats

Das Na-Lactat wurde zusammen mit 100 ml aqua dest. und 10 ml 10 N H_2SO_4 in den Kolben der Abbauapparatur gegeben. Zur Oxydation des bei der Reaktion entstehenden, flüchtigen SO_2 zu SO_4^{--} , wurde zwischen Kühler und CO_2 -Fallen ein Gefäß mit saurer, halbkonzentrierter Kaliumpermanganatlösung geschaltet. In der Zeit, in der die Apparatur mit nachgereinigtem N_2 CO_2 -frei gespült wurde, waren die CO_2 -Fallen noch nicht mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ gefüllt. Zu Versuchsbeginn wurden die Fallen mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ angeschlossen und über einen Hahn 10 ml einer CO_2 -freien, gesättigten Kaliumbichromatlösung in den Reaktionskolben eingeleitet.

Die Stickstoffspülung wurde abgestellt und die Reaktionslösung 20 min lang gekocht. Danach wurde das in der Apparatur befindliche CO_2 mit Hilfe von N_2 30 min lang in die Fallen gespült. Der bei der Decarboxylierung des Lactats entstehende Acetaldehyd wurde in der Chromatlösung zu Essigsäure oxidiert und wie beschrieben (10.1) destilliert. Der Abbau der Essigsäure ist unter 14.3 beschrieben.

14.2. Decarboxylierung des Alanins

Alanin wurde mit Hilfe von Ninhydrin decarboxyliert. In den Reaktionskolben wurden 245 mg Citratpuffer, pH 2.5 (2.06 g Trinatriumcitrat $\times$ 2 H_2O und 19.15 g Citronensäure $\times$ H_2O) 10 ml H_2O dest und 195 mg Ninhydrin, sowie, neben dem markierten Alanin, 0,35 mM unmarkiertes Alanin gegeben. Zwischen dem oberen Teil des Kühlers und den CO_2 -Absorptionsfallen, wurde eine Falle mit 50 ml eisgekühlter Chromschwefelsäure geschaltet, in der das entstehende und mit dem N_2 -Strom abtreibende Acetaldehyd zu Essigsäure oxydiert wurde. Nach 20 min Vorspülzeit wurden die CO_2 -Fallen angeschlossen und das Reaktionsgemisch für 20 min gekocht. Danach wurde die Apparatur 60 min mit N_2 durchspült, um auch den Acetaldehyd quantitativ in die Chromschwefelsäure zu bringen. Die Essigsäure wurde wie beschrieben (10.1) destilliert.

14.3. Totaloxydation und Decarboxylierung des Acetats

Das bei der Gärung direkt und das aus Äthanol entstandene, sowie das bei der Decarboxylierung von Lactat und Alanin entstandene Acetat wurde folgendermaßen abgebaut: 1/3 der Substanz wurde zur Totaloxydation, 2/3 zur Decarboxylierung herangezogen. Die Aktivität in der Methylgruppe des Acetats wurde durch Differenzbildung ermittelt.

14.3.1. Totaloxydation

Die Essigsäure wurde mit 100 ml aqua dest. in den Kolben der Apparatur gegeben und mit 1 g Kaliumperoxodisulfat versetzt. Nach dem Durchspülen mit N_2 und Anschluß der $Ba(OH)_2$ -Fallen, wurden über einen Seitenarm 2 ml einer 2 % $AgNO_3$ -Lösung gegeben und das Reaktionsgemisch auf $70^\circ C$ erhitzt. Die Oxydation dauerte 45 min. War die Lösung nach dieser Zeit noch braun, so wurde sie kurz aufgekocht. Das CO_2 wurde anschließend 20 min lang in die Fallen gespült.

14.3.2. Decarboxylierung

Das Acetat wurde in jeweils kleinen Mengen im Reaktionsgefäß eingedampft, wobei darauf geachtet wurde, daß die Probe nur den Boden bedeckte und nicht über die Wände verschmiert war. Bevor unter Eiskühlung 30 μl 100 % H_2SO_4 (3 T H_2SO_4 konz + 1 T H_2SO_4 rauchend) zugegeben wurde, wurde die Probe sorgfältig getrocknet. Nachdem sich das Salz in der Wärme (Handtemperatur) gelöst hatte, wurden 50 mg Natriumazid hinzugefügt (Eiskühlung) und in Lösung gebracht (Handtemperatur). An die Apparatur waren 2 SO_2 -Fallen und 2 CO_2 -Fallen angeschlossen. Nach 15 min Spülung mit N_2 wurden die $Ba(OH)_2$ -Gefäße angeschlossen und das Reaktionsgemisch langsam auf $70^\circ C$ erhitzt. Während der Versuchszeit wurde ständig N_2 durch die Apparatur gedrückt. Nach 45 min war der Versuch beendet. CO_2 wurde dann noch 20 min lang in die Fallen gespült.

15. Messung der Radioaktivität

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden Strahlenmeßgeräte der Firma Friesseke und Höpfner, Erlangen, benutzt.

Von den zu messenden Proben wurden aliquote Mengen (10-20 μ l) auf einer Heizplatte vorsichtig eingedampft und im Methan-durchflußzählrohr gezählt.

Die Messung gelöster Substanzen erfolgte in unendlich dünner Schicht.

Nach dieser Methode wurden gezählt:

- a) nichtaggressive Flüssigkeiten (neutralisierte Lösungen, Bakteriensuspensionen) auf Aluminiumplättchen ($\emptyset$ 6 cm)
- b) aggressive Lösungen (KOH) auf Kupferplättchen (Kantenlänge = 2 cm)

Die Messung von BaCO_3 wurde, wie unter 14. beschrieben, in unendlich dicker Schicht ausgeführt.

Radioaktive Substanzen auf Chromatogrammen wurden durch Radioautographie auf Agfa-Röntgenpapier lokalisiert. Zur Messung radioaktiver Substanzen auf Chromatogrammen wurden die auf dem Röntgenpapier aufgetretenen Flecke vor einem Leuchtschirm auf die Chromatogramme durchgezeichnet und die radioaktiven Bereiche mit einem großflächigen Methan-durchflußzählrohr mit Endfenster gemessen.

III. Ergebnisse

1. Vergleich der zur Artabgrenzung verwendeten physiologischen Eigenschaften

Von allen uns zur Verfügung stehenden Stämmen wurden die üblicherweise zur Unterscheidung der Arten von Cellulomonas herangezogenen Merkmale untersucht (Tab.2)

1.1. Morphologie

Mikrophotographien aller Stämme nach 15 Std. und 14 Tagen Wachstum in HD-Medium sind in Abb. 1 zusammengestellt.

Nach 15 Std. Wachstum zeigen nahezu alle Stämme die typisch coryneforme Gestalt, mit der für diese Organismen besonderen Zellteilung ("snapping division"), bei der die Zellen bis zur völligen Trennung in Form eines V zusammenhängen. Bei allen Stämmen ist während des Wachstums eine deutliche Änderung

Tab.2: Verschiedene Eigenschaften der untersuchten Stämme

Organismus	Beweglichkeit	NO ₃ -Reduktion	NH ₄ aus Pepton	Substratverwertung *				
				Ribose	Raffinose	L-Lactat	Gluconat	Acetat
C.biazotea ATCC 486	+ (+)**	+ (+)	+ (-)	+	+	+	-	+
C.cartalyticum ATCC 21681	-	+	+	+	-	+	+	+
C.cellasea NCIB 8078	- (+)	+ (+)	- (-)	-	-	+	-	+
C.fimi ATCC 484	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+	-	+	-	-
C.fimi ATCC 15724	+ (+)	+ (+)	+ (+)	+	-	+	-	-
C.flavigena ATCC 482	- (-)	+ (+)	- (-)	+	-	-	+	+
C.biazotea Lechevalier	-	+	-	+	-	-	+	+
C.flavigena DS Vaughn	+	+	+	+	-	-	-	+
C.gelida ATCC 488	+ (+)	+ (-)	+ (-)	+	-	-	-	+
C.subalbus NCIB 8075	+	+	+	+	-	-	-	+
C.uda ATCC 491	- (-)	+ (+)	+	+	-	-	-	+
C.species ATCC 21399	-	+	+	+	-	-	-	+

* = Alle Stämme verwerten D-Glucose, Saccharose, Lactose, D-Xylose, L-Arabinose, Cellulose, Pyruvat, Malat, Glycerin und verflüssigen Gelatine.
Mannit und D-Lactat werden nicht verwertet.

** = Die in Klammern gesetzten Angaben beziehen sich auf Bergey's Manual, 7.Auflage

Abb. 1: Morphologie der Cellulomonasstämmе.
 Phasenkontrastaufnahmen von 15 Std.
 und 14 Tage alten Kulturen.
 Vergrößerung 1 : 1 000.





C. cartalyticum ATCC 21681

14 Tage



C. cellasea NCIB 8078

14 Tage



15 Std.



15 Std.

C. fimi ATCC 484

15 Std.

14 Tage



C. fimi ATCC 15724

15 Std.

14 Tage





14 Tage

C. flavivigna ATCC 482



14 Tage

C. flavivigna DS/Vaughn



15 Std.

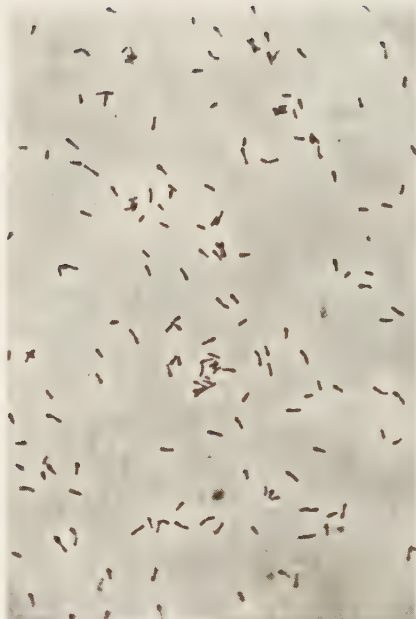


15 Std.



14 Tage

C. gelida ATCC 488



C. subalbans NCIB 8075



15 Std.

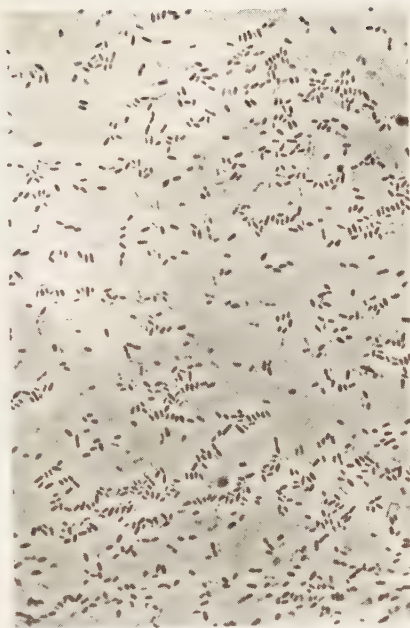


15 Std.



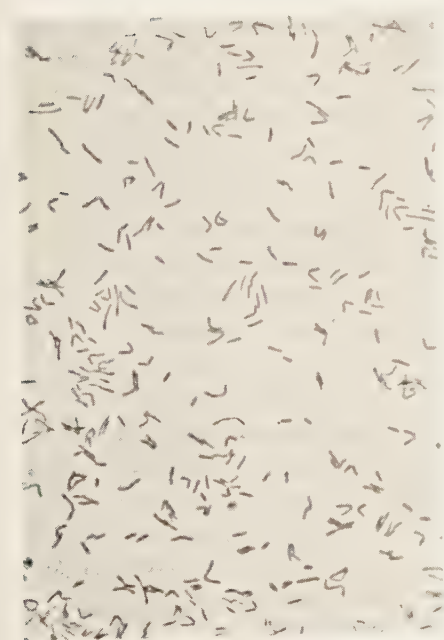
14 Tage

C. uda ATCC 491



14 Tage

C. species ATCC 21399



15 Std.



15 Std.

der Gestalt erkennbar. Dieser Formenwechsel ist bei *C.cartalyticum* besonders stark ausgeprägt. In 14 Tage alten Kulturen finden sich neben lysierten, stäbchenförmigen Hüllen vorwiegend kokkenförmige Zellen. Bei allen anderen Stämmen besteht die Änderung vor allem in der Ausbildung kürzerer, kompakterer Zellen. Doch auch bei *C.gelida*, *C.subalbus* und den beiden Stämmen von *C.fimi* sind Ansätze zur Bildung kokkenförmiger Zellen zu erkennen.

Die Morphologie scheint mehr stamm- als artspezifisch zu sein, wie die unterschiedliche Gestalt der beiden Stämme von *C.fimi* zeigt.

1.2. Gramfärbung

Ähnlich wie die meisten coryneformen Organismen werden auch die *Cellulomonas*stämme als Gram-variabel bezeichnet. Da die Beurteilung der Anfärbbarkeit nach Gram von der Geschwindigkeit der Entfärbung durch Alkohol abhängt, wurde zur Überprüfung des Begriffs "Gram variabel" bei den von uns untersuchten Stämmen die Zeit der Alkoholeinwirkung variiert.

Zellen aus der log-Phase wurden für 2.5 min mit Gentianaviolett gefärbt und 1 min mit Lugol'scher Lösung behandelt. Die Dauer der anschließenden Behandlung mit Alkohol betrug 3, 6, 9, 30, 60 und 120 sec. Danach wurde jeweils 15 sec. mit Safranin gegengefärbt.

Alle Stämme der Gattung *Cellulomonas* waren nach 9 sec. Alkoholbehandlung noch nicht entfärbt. (Grampositiv). Nach 30 sec. Entfärbungszeit traten neben 90 % blau gefärbten auch schon 10 % rot gefärbte Bakterien auf, nach 60 sec. was das Verhältnis bereits umgekehrt. Nach 120 sec. Entfärbungszeit erschienen alle Bakterien Gram negativ. Demgegenüber erwiesen sich die als Vergleichsstämme verwendeten, und als eindeutig Gram positiv bzw. Gram negativ bekannten

Lactobacillus plantarum und *Escherichia coli*, auch noch nach 2 min Entfärbungszeit als eindeutig Gram positiv bzw. schon nach 3 sec. Entfärbungszeit als eindeutig Gram negativ.

Die *Cellulomonas*-Stämme verhalten sich eindeutig Gram positiv und keineswegs Gram variabel. Sie stimmen in der raschen Entfärbungszeit, die jedoch nicht so rasch ist, wie die der eindeutig Gram negativen Enterobakterien, mit anderen coryneformen Organismen überein.

Zur Beurteilung der Anfärbbarkeit nach Gram sollten die Stämme also nur 9 sec., jedoch nicht 30 sec. mit Alkohol behandelt werden. Die Ursache des abweichenden Verhaltens dieser Stämme gegenüber *Lactobacillus plantarum* kann in der wesentlich dünneren peptidoglycanhaltigen Zellwand coryneformer Organismen (um 200 Å) gegenüber der der Lactobacillen (350-500 Å) gesehen werden.

1.3. Zellwand

Die Zellwand wurde sowohl hinsichtlich der Polysaccharidzusammensetzung als auch hinsichtlich der Mureinstruktur untersucht. Die Untersuchungen an 10 der 12 Stämme wurden bereits von Fiedler und Kandler (1972) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

1.3.1. Peptidoglycan

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß bis auf *C. cartalyticum* alle Arten als Diaminosäure L-Ornithin enthalten. Durch die Ergebnisse von Partialhydrolysaten lassen sich in dieser großen Gruppe folgende Unterscheidungen treffen : Während bei der Mehrzahl der Stämme D-Glutaminsäure die Interpeptidbrücke bildet, ist bei den Stämmen von *C. flavigena* ATCC 482 und *C. biazotea*, Lechevalier, diese Position durch D-Asparaginsäure besetzt.

C. flavigena DS, den wir von Vaughn erhielten, besitzt entgegen den Erwartungen nicht D-Asparaginsäure, sondern D-Glutaminsäure. Bei *C. biazotea* sind eindeutig beide Glutaminsäuren amidiert, während bei allen anderen im Allgemeinen nur ein Glutaminsäurerest, vermutlich der der Peptiduntereinheit, mehr oder weniger vollständig amidiert ist.

Tab. 3: Übersicht über die Peptidoglycantypen und die Zuckerzusammensetzung der Zellwände

Organismus	Peptidoglycantyp	Zellwandzucker							
		Glucose	Mannose	Rhamnose	Fucose	Ribose	6-Desoxytalose	Glucosamin	Galaktose
<i>C. biazotea</i> ATCC 486 ₁ .	L-Orn- -D-Glu-	-	+	++	-	-	+	++	+
<i>C. cartalyticum</i> ATCC 21681	L-Lys-D-Ser -Asp ₂ .	-	-	++	+	-	-	-	+
<i>C. cellasea</i> NCIB 8078 ₁ .	L-Orn- -D-Glu-	-	+	++	-	-	+	-	-
<i>C. fimi</i> ATCC 484 ₁ .	L-Orn- -D-Glu-	+	-	++	+	-	-	++	-
<i>C. fimi</i> ATCC 15724 ₁ .	L-Orn- -D-Glu-	+	-	++	+	-	-	++	-
<i>C. flavigena</i> ATCC 482 ₁ .	L-Orn- -D-Asp-	-	+	++	-	+	-	++	-
<i>C. biazotea</i> Lechevalier ₁ .	L-Orn- -D-Asp-	-	+	++	-	+	+	++	-
<i>C. flavigena</i> DS Vaughn	L-Orn- -D-Glu-	+	-	-	-	-	-	++	-
<i>C. gelida</i> ATCC 488 ₁ .	L-Orn- -D-Glu-	+	-	-	-	-	-	++	-
<i>C. subalbus</i> NCIB 8075 ₁ .	L-Orn- -D-Glu-	+	-	-	-	-	-	(+)	-
<i>C. uda</i> ATCC 491 ₁ .	L-Orn- -D-Glu-	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. species</i> ATCC 21399 ₁ .	L-Orn- -D-Glu-	+	-	-	-	-	-	+	-

1. Fiedler und Kandler (1973)

2. Die Konfiguration der Asparaginsäure wurde nicht bestimmt

C. cartalyticum weist die größte Abweichung auf. Sein Peptidoglycan besitzt als Diaminosäure Lysin; die Interpeptidbrücke wird von D-Serin und Asparaginsäure gebildet.

1.3.2. Zellwandzucker

Die Zellwände der beiden Stämme von *C. fimi* sowie die von *C. flavigena* DS, *C. gelida*, *C. subalbus*, *C. uda* und *C. species* weisen die gleiche Zuckerzusammensetzung auf, während die der anderen 5 Stämme voneinander verschieden ist (Tab.3). Ein Vergleich der Werte aus Tab. 2 und 3 zeigt, daß es sich bei *C. flavigena* ATCC 482 und *C. flavigena* DS nicht um Stämme der gleichen Art handeln kann.

1.4. Beweglichkeit

6 von 12 Stämmen sind beweglich.

Bei *C. biazotea* war die Beweglichkeit nicht konstant. Während der Stamm bei den ersten Überimpfungen nach Erhalt von der ATCC beweglich war, konnte später keine Bewegung mehr beobachtet werden. Der Stamm zeigte erneut Beweglichkeit, als das Nährmedium anstelle von H₂O dest. mit Leitungswasser zubereitet wurde. Aber auch hier ging sie bei weiteren Überimpfungen wieder verloren.

Cellulomonas biazotea, *Lechevalier* und *C. cellasea* waren stets unbeweglich, obwohl letzterer nach den Angaben von Clark (1951) beweglich sein sollte.

C. subalbus zeigte in HD-Medium nur schwache oder keine Beweglichkeit, während sie im HD-Medium ohne Glucose lebhaft war. *C. gelida*, *C. flavigena* DS und die beiden Stämme von *C. fimi* waren in beiden Medien stark beweglich.

1.5. Nitratreduktion

Die Ergebnisse der Nitritbildung aus Nitrat stimmen, mit Ausnahme des von *C. gelida* ATCC 488, mit denen in Bergey's Manual überein.

1.6. NH₃-Bildung aus Pepton

Bis auf *C.biazotea* ATCC 486 stimmen alle Ergebnisse der Ammoniakbildung mit den Angaben von Clark (1951) überein. Eine Angabe über die NH₃-Produktion von *C.uda* fehlt in Bergey's Manual.

Auch in diesem Merkmal stimmt *C.biazotea*, Lechevalier, nicht mit *C.biazotea* ATCC 486, sondern mit *C.flavigena* ATCC 482 überein.

1.7. Cellulosehydrolyse

Alle Stämme sind in der Lage, Cellulose in Form von Filterpapierschnitzel zu hydrolysieren. Die Papierschnitzel werden dabei von den Seiten her angegriffen, so daß eine Zerstörung zuerst in einer Abrundung der Ecken und an der Bildung von Buchten an den Seiten sichtbar wird. Nach spätestens 3 Tagen sind die Papierschnitzel zu einer breiigen Masse hydrolysiert.

1.8. Gelatineverflüssigung

Der Nachweis proteolytischer Exoenzyme war bei allen Stämmen positiv, was mit den Ergebnissen von Clark (1951) übereinstimmt. Die Gelatineverflüssigung tritt zwischen dem 7. und dem 12. Tag ein.

1.9. Zuckerwertung

Glucose, Saccharose, Lactose, L-Arabinose und D-Xylose werden von allen Stämmen rasch verwertet. Ribose dagegen wird nur von *C.cartalyticum* und *C.flavigena* ATCC 482 rasch, von der Mehrzahl der übrigen Stämme langsam und von *C.cellasea* überhaupt nicht verwertet. Mannit wird von keinem Stamm, Raffinose ausschließlich von *C.biazotea* ATCC 486 verwertet, was ihn wiederum von *C.biazotea*, Lechevalier, unterscheidet.

1.10. Säurewertung

Malat und Pyruvat werden von allen Stämmen abgebaut. Ebenso Acetat, allerdings mit Ausnahme der beiden Stämme von *C.fimi*.

L-Lactat wird von rund der Hälfte der Stämme angegriffen. Die Fähigkeit dazu haben *C.biazotea* ATCC 486, *C.cartalyticum*, *C.cellasea* und die beiden Stämme von *C.fimi*. D-Lactat wird dagegen von keinem Stamm angegriffen. Da bei unseren Versuchen L- und D-Lactat zusammen angeboten wurden, war es nicht auszuschließen, daß D-Lactat den Abbau von L-Lactat kompetitiv hemmt. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden zwei nicht L-Lactat-verwertende Stämme, *C.gelida* und *C.subalbus*, in Parallelversuchen jeweils mit reinem L-Lactat und D-Lactat inkubiert. Aber auch unter diesen Bedingungen wurde weder das eine, noch das andere Substrat abgebaut. Man kann daraus schließen, daß die fehlende L-Lactatverwertung bei Anwesenheit beider Stereoisomere im Medium nicht auf einer Hemmung durch D-Lactat beruht. Gluconat wird sowohl von *C.cartalyticum* als auch von *C.biazotea*, Lechevalier, und *C.flavigena* ATCC 482 als Substrat benutzt. Auch hierin zeigt sich die Identität der beiden letztgenannten Stämme.

Da nach diesen Ergebnissen die Stämme *C.biazotea*, Lechevalier, und *C.flavigena* ATCC 482 identisch sind und zu *C.flavigena* gehören, wurden die Untersuchungen an *C.biazotea*, Lechevalier, eingestellt.

2. Säurebildung.

Aus Tab. 2 geht hervor, daß sich die verschiedenen Arten auf Grund ihrer Zucker- und Säureverwertung nur unvollständig unterscheiden lassen. Um zu einer weiteren Differenzierungsmöglichkeit zu gelangen, haben wir die Lactat- und Acetatbildung durch wachsende Zellen im Medium und durch ruhende Kulturen im Puffer untersucht.

In Vorversuchen wurde die Art der gebildeten Lactatisomere bestimmt. Es handelte sich bei allen Stämmen und allen Substraten unter beiden Bedingungen um L-Lactat.

2.1. Bildung von Acetat und L-Lactat aus Glucose im HD-Medium.

Die Stämme wurden aerob bei 30°C in 30 ml HD-Medium kultiviert. Am 1., 2., 3., 4., 8. und 21. Tag wurde jeweils eine Probe entnommen und pH-Wert und L-Lactat bestimmt. Der Acetatgehalt wurde bei den meisten Stämmen am 2., 4. und 21. Tag analysiert.

Abb. 2 zeigt für jeden Stamm die Bildung von L-Lactat und Acetat während des Wachstums, sowie den Verlauf des pH-Wertes.

Tab. 4 gibt eine Übersicht über den L-Lactat- und Acetatgehalt in µg/ml Medium am 2. und 4. Tag. In der rechten Spalte ist jeweils das Verhältnis Acetat/L-Lactat angegeben.

Aus Abb. 2 und Tab. 4 sind folgende Ergebnisse abzulesen :

- a) Alle Stämme säuern das Medium auf pH 5.4 - 4.6 an.
Manche Stämme zeigen dabei ein Maximum nach 2 bis 3 Tagen, nach dem das Medium wieder basischer wird. Die pH-Zunahme ist bei *C.flavigena* ATCC 482 und *C.subalbus* schwach, bei *C.cartalyticum* dagegen stark ausgeprägt.
- b) 8 der 11 Stämme bilden sowohl L-Lactat als auch Acetat, wobei, bis auf *C.gelida* und *C.flavigena* ATCC 482, Acetat überwiegt.
- c) 3 Stämme, *C.fimi* ATCC 484 und ATCC 15724 und *C.cellasea* bilden ausschließlich Acetat. Bei ihnen ist zu keiner Zeit L-Lactat nachzuweisen.
- d) 2 Stämme sind in der Lage, die von ihnen in das Medium ausgeschiedenen Säuren wieder zu verwerten. Das gilt besonders für *C.cartalyticum*, das sowohl Acetat, als auch L-Lactat wieder aufnimmt. *C.subalbus* dagegen verwertet nur das gebildete L-Lactat, während Acetat nicht angegriffen wird.

Abb. 2

Lactat- u. Acetatgehalt ($\mu\text{M}/30\text{ml}$) i. Hefe-Dextrose Medium bei Verwertung von Glucose durch aerobe Kulturen



Tab.4: Acetat- und L-Lactatgehalt im Hefe-Dextrose Medium

Die Werte sind in μg Säure/ml angegeben.

Q = Acetat/Lactat

Organismus	2. Tag			4. Tag		
	Acetat	Lac- tat	Q	Acetat	Lac- tat	Q
<i>C.biazotea</i> ATCC 486	978	78	12.5	1220	84	14.5
<i>C.cartalyticum</i> ATCC 21681	357	66	5.4	229	0	ausschl. Acetat
<i>C.cellasea</i> NCIB 8078	24	0	ausschl. Acetat	84	0	ausschl. Acetat
<i>C.fimi</i> ATCC 484	480	0	ausschl. Acetat	1140	0	ausschl. Acetat
<i>C.fimi</i> ATCC 15724	600	0	ausschl. Acetat	1200	0	ausschl. Acetat
<i>C.flavigena</i> ATCC 482	16	255	0.06	68	402	0.17
<i>C.flavigena</i> DS Vaughn	444	147	3.02	616	230	2.70
<i>C.gelida</i> ATCC 488	90	459	0.2	98	576	0.17
<i>C.species</i> ATCC 21399	829	48	17.3	1000	59	16.9
<i>C.subalbus</i> NCIB 8075	32	24	1.3	124	16	7.7
<i>C.uda</i> ATCC 491	400	48	8.3	610	89	6.9

2.2. Bildung von Acetat und L-Lactat bei der Glucose- vergärung im Puffer

Da alle Cellulomonasstämme auch ohne Kohlenhydrate sehr gut in einem Pepton-Hefeextrakt-Medium wachsen, wurden, um die Säurebildung ausschließlich aus Kohlenhydraten und in Abwesenheit weiterer verwertbarer C-Quellen zu prüfen, ruhende Kulturen mit Glucose im Puffer inkubiert.

Die Versuche wurden im Warburgapparat unter aeroben und anaeroben Bedingungen ausgeführt.

Die meisten Stämme schieden unter aeroben Bedingungen innerhalb von 2 Stunden zwischen 5 und 12 % der verbrauchten Glucose als L-Lactat und Acetat aus. Bei *C.flavigena* ATCC 482 waren es 20 %, bei *C.cartalyticum* sogar 40 %. Unter anaeroben Bedingungen wurden 80-90 % der verwerteten Glucose als Acetat oder L-Lactat wiedergefunden.

Tab. 5 zeigt die Daten der L-Lactat- und Acetatbildung. Analog zu Tab. 4 ist auch hier der Quotient Acetat/Lactat angeführt.

- a) Die Ergebnisse des Versuches unter aeroben Bedingungen ähneln in großen Zügen denen des aeroben Abbaues der Glucose während des Wachstums. *C.flavigena* ATCC 482 und *C.gelida* sind auch hier die einzigen, die mehr L-Lactat als Acetat bilden. Bei allen anderen überwiegt Acetat. Abweichend vom Wachstumsversuch verhalten sich folgende Stämme: Bei *C.cellasea* und *C.fimi* ATCC 15724, die im HD-Medium kein L-Lactat gebildet hatten, ist dieses im Puffer nachzuweisen. Dagegen wird bei *C.uda* im Puffer kein L-Lactat gefunden, während es im Medium gebildet wird.
- b) Unter anaeroben Bedingungen sind im Puffer alle Stämme in der Lage, neben Acetat auch L-Lactat aus Glucose zu bilden. Die Menge des gebildeten Acetats übertrifft auch

Tab.5: Acetat- und Lactatgehalt im Puffer.

Ansatz pro Versuch:

1. aerob: Puffer pH 6.5, 0.1 M, 1.5 ml
 Glucose 1 % 0.5 ml
 Suspension 0.5 ml
 KOH 5 % 0.4 ml
 Gasphase: Luft
2. anaerob: Puffer pH 5.5, 0.1 M, 2 ml
 Glucose 1 % 0.5 ml
 Suspension 0.5 ml
 Gasphase: N₂

Zeit: 3 Stunden

Die Werte sind in µg Säure/ml/mg Protein angegeben.

Q = Acetat/Lactat

Organismus	aerob			anaerob		
	Acetat	L-Lactat	Q	Acetat	L-Lactat	Q
C.biazotea ATCC 436	25.7	10.7	2.4	99.8	97	1.01
C.cartalyticum ATCC 21681	36.9	33.4	1.1	15.5	0.4	38.6
C.cellasea NCIB 8078	22.2	3.2	6.9	47.2	50	0.94
C.fimi ATCC 484	15.1	0.0	ausschl. Acetat	76.7	6.2	12.3
C.fimi ATCC 15724	12.0	0.5	24.0	45.0	0.9	5.0
C.flavigena ATCC 482	12.9	77.6	0.17	39.4	61.0	0.65
C.gelida ATCC 488	3.1	4.8	0.64	9.3	6.1	1.5
C.species ATCC 21399	13.1	4.5	2.90	63.5	25.1	2.5
C.subalbus NCIB 8075	11.9	2.7	4.40	97.6	33.9	2.9
C.uda ATCC 491	62.1	0.0	ausschl. Acetat	97.6	13.2	7.4

unter diesen Bedingungen bei nahezu allen Stämmen die des L-Lactats. Ausnahmen sind *C.flavigena* ATCC 482, der aerob wie anaerob mehr L-Lactat als Acetat bildet und *C.cellulosa*, der anaerob etwas mehr L-Lactat als Acetat bildet, während unter anaeroben Bedingungen 7 mal so viel Acetat wie L-Lactat gebildet wird.

Auffällig ist, daß *C.catalyticum* anaerob fast kein L-Lactat bildet. Dieser Stamm unterscheidet sich außerdem noch von allen anderen Stämmen dadurch, daß er unter aeroben Bedingungen mehr Säure produziert als unter anaeroben. Dieses Ergebnis ähnelt dem von 3 Stämmen aus der Gattung *Arthrobacter*, *A. citreus* ATCC 11631, *A.oxydans* ATCC 14358 und *A.polychromogenes* ATCC 15216, bei denen dieses Phänomen bei der Bildung von L-Lactat beobachtet wurde (Stackebrandt, 1971).

Zusammenfassend kann man sagen, daß generell alle Stämme in der Lage sind, sowohl Acetat als auch L-Lactat zu bilden. Ob diese Produkte nachzuweisen sind, hängt davon ab, wie rasch die Organismen sie wieder verwerten.

Es scheint so zu sein, daß alle Organismen, die L-Lactat als einzige Kohlenhydratquelle verwerten, auch das während des Wachstums in das Medium ausgeschiedene L-Lactat wieder dissimilieren können.

2.3. Abhängigkeit der Säurebildung vom pH-Wert des Puffers

Um zu untersuchen, ob der pH-Wert des Puffers die Säurebildung beeinflusst, wurden 2 Stämme in Pufferlösungen mit 2 verschiedenen pH-Werten anaerob mit Glucose inkubiert, wobei die Versuchszeit variiert wurde. Die Säuren wurden säulenchromatographisch isoliert und durch Titration quantitativ bestimmt. Zur Kontrolle wurde eine enzymatische Bestimmung von Acetat und L-Lactat direkt aus der Nährlösung durchgeführt. CO_2 und Äthanol wurden nicht bestimmt. Die Tab. 6 zeigt die gebildete Säuremenge.

Tab.6: Säurebildung aus Glucose durch ruhende Kulturen in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Ansatz: Phosphatpuffer : 0.1 M, 15 ml
 Glucose: 375 µM in 5 ml Puffer
 Bakteriensuspension: 5 ml
 Gasphase: N₂
 a. = µM Säure/Ansatz
 b. = Prozentualer Anteil der Säure an der Gesamtsäuremenge.

Organismus	Zeit in Std.	Formiat		Acetat		L-Lactat		Succinat	
		a	b	a	b	a	b	a	b
C.biazotea ATCC 486 pH 5.5	4	15.9	11.4	95.5	67.8	26.8	19.0	2.6	1.8
	6	28.5	21.9	85.2	65.5	10.5	18.1	5.8	4.5
	4	70.0	30.4	126.7	55.0	26.2	11.4	7.1	3.1
	6	104.2	37.3	143.2	51.3	14.3	5.3	17.4	6.2
C.fimi ATCC 484 pH 5.5	4	13.2	11.1	80.1	67.3	25.7	21.6	0.0	0.0
	7	104.3	31.5	207.5	62.7	17.1	5.1	2.3	0.7
	4	102.9	48.4	92.9	43.7	16.8	7.9	0.0	0.0
	7	228.2	47.1	235.1	48.5	11.5	2.4	9.6	2.0

Aus diesem Versuch ergibt sich :

- a) Neben Acetat und L-Lactat werden noch Formiat und, in geringerem Ausmaß, Succinat gebildet.
- b) Die Formiatbildung ist stark pH-abhängig. Während bei pH 5.5 nur wenig Formiat und viel CO_2 gebildet wird, ist bei pH 6.5 die Bildung von Formiat stark begünstigt. Die Menge des gebildeten CO_2 wurde zwar nicht direkt gemessen, sie kann aber durch Differenzbildung der Mengen an C_2 und C_1 Stücken errechnet werden.

Das Phänomen, daß im basischen Milieu Formiat unverändert liegen bleibt, während es im sauren Milieu unter Wasserstoffbildung zu CO_2 oxydiert wird, ist bei vielen Organismen aus verschiedenen Familien beobachtet worden und deckt sich mit Beobachtungen, die von Platt und Foster (1957) an *Streptococcus faecalis* und von Tikka (1935) an *Escherichia coli* ausführlich beschrieben worden sind.

Wie man heute weiß, erfolgt die Bildung von Formiat durch eine phosphoroklastische Spaltung von Pyruvat in Acetyl-P und Formiat. Formiat kann bei *E. coli* z.B. bei pH 6-7 als Formiat liegen bleiben, oder, bei pH 5-6 zu H_2 und CO_2 gespalten werden. Es muß jedoch nicht zwangsläufig bei saurem pH zu einer Spaltung von Formiat unter Bildung von freiem Wasserstoff kommen, wie z.B. die Ergebnisse von Deibel und Niven (1964) an *Str. faecalis* zeigen.

Eine Wasserstoffentwicklung wird in manometrischen Versuchen in Form einer Druckzunahme sichtbar. In unseren Versuchen wurde CO_2 , das ebenfalls eine Druckzunahme bewirkt, in Kalilauge als K_2CO_3 gebunden, um ausschließlich die durch eventuell gebildeten Wasserstoff hervorgerufene Druckzunahme zu messen. Da bei keinem Versuch eine Druckzunahme beobachtet wurde, kann man eine Wasserstoffbildung ausschließen. Die bei der Spaltung von Formiat entstehenden Reduktionsäquivalente werden bei unseren Versuchen unter anaeroben Bedingungen vermutlich unter Alkoholbildung auf Acetaldehyd und unter

aeroben Bedingungen auf Sauerstoff übertragen. Die Bildung von Alkohol wurde zwar nicht in diesem Versuch, jedoch in späteren Versuchen (Tab. 10.2, 13, 21) nachgewiesen.

3. Bestimmung der Abbauewege für Glucose

Der Einsatz spezifisch markierter Substrate gibt Information darüber, welche C-Atome des Substrates in welchen Positionen des Endproduktes erscheinen und erlaubt damit Rückschlüsse auf die Abbaumechanismen.

So wurde mit Hilfe dieser Methode der Abbau der Glucose über den Emden-Meyerhof-Weg bei der homofermentativen Milchsäuregärung durch *Lactobacillus casei* (Gibbs et al. 1950) und bei der Alkoholgärung durch Hefen (Koshland und Westheimer, 1950) bestätigt, der Mechanismus der heterofermentativen Milchsäuregärung an *Leuconostoc mesenteroides* (Gunsalus und Gibbs, 1952) geklärt und ergänzende Untersuchungen bei der Aufklärung der Homoactatgärung bei Clostridien (s. Ljungdahl und Wood, 1969) durchgeführt. Diese Beispiele ließen sich beliebig vermehren.

In der vorliegenden Arbeit wurden positionsmarkierte Substrate dazu verwendet, die Abbauewege der Glucose in der Gattung *Cellulomonas* zu klären.

3.1. Radiorespirometrie

Die Verschiedenheit der Abbauewege von Substraten hat u.a. zur Folge, daß das in unterschiedlichen Positionen lokalisierte ^{14}C mit verschiedener Rate als CO_2 freigesetzt wird. Umgekehrt kann man aus der Geschwindigkeit der Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$ beim Abbau positionsmarkierter Substrate auf den dabei eingeschlagenen Abbauweg schließen. Diese Methode, die Radiorespirometrie genannt wird, wurde von Wang et al. (1958) ausführlich diskutiert und mit Erfolg sowohl bei der Analyse von Abbauwegen, als auch beim Vergleich von Bakterien angewendet.

3.1.1. Radiorespirometrie unter aeroben Bedingungen

Ruhende Kulturen wurden in den Atmungsströgen eines Warburg-apparates in Parallelansätzen 2 Std. mit gleichen Mengen positionsmarkierter Glucosen inkubiert. Die Versuchszeit wurde so bemessen, daß das Substrat nicht bis zu Ende veratmet werden konnte. Träte letzteres ein, so würden sich die Unterschiede in der Freisetzung von CO_2 aus den verschiedenen Positionen wieder vermindern, weil die vorübergehend angereicherten Gärprodukte über den Zitronensäurezyklus weiter abgebaut worden wären.

Die Markierung wurde im Überstehenden, in den Bakterien und im abgefangenen CO_2 bestimmt und in Prozent des eingesetzten ^{14}C ausgedrückt.

Die Ergebnisse von 5 Arten sind in Tab. 7 zusammengefaßt: Die Summe der Prozentwerte weicht in manchen Versuchen stark von 100 % ab. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei der Messung des Mediums in unendlich dünner Schicht flüchtige Gärprodukte verloren gegangen sind.

Die im Medium wiedergefundene Markierung stammt sowohl von noch nicht verwerteter markierter Glucose, als auch von aus-
geschiedenen, markierten Gärprodukten. Auf Grund der ver-
schieden hohen Markierung, die in den Bakterien wiedergefun-
den wird, kann man auf eine unterschiedlich starke Assimila-
tion der Glucose schließen. Ein deutlicher Einbau von ^{14}C
findet vor allem bei *C. flavigena*, *C. gelida* und *C. uda* statt.
Man erkennt aus den Werten für CO_2 , daß aus den Positionen
3 und 4 der Glucose ein hoher, aus den Seitenpositionen ein
geringerer Prozentsatz der Markierung in CO_2 gelangt. Diese
Markierungsverteilung spricht für einen Abbau der Glucose
über den Emden-Meyerhof-Weg (EMP-Weg). Bei diesem Weg wird
die Glucose in Pyruvat umgewandelt, wobei die Carboxyl-
gruppen des Pyruvats C-3 und C-4 der Glucose entsprechen.
Diese C-Atome werden bei der Decarboxylierung des Pyruvats
als CO_2 abgespalten und müßten daher in gleichen Mengen ent-

Tab.7: Verteilung von ^{14}C nach Veratmung von positionsmarkierten Glucosen durch Cellulomonasstämme.

Ansatz: Phosphatpuffer 0.1 M, pH 6.5
Markierte Glucosen : 1.5×10^5 Ipm
Gasphase: Luft

Zeit: 2 Stunden

Werte in Prozent des eingesetzten ^{14}C

Stamm	Markierung	CO_2	Bakterien	Medium	Ausbeute in Prozent
C.biazotea ATCC 486	1- ^{14}C	15.9	7.9	67.2	91.0
	2- ^{14}C	15.1	8.4	67.3	90.8
	3,4- ^{14}C	48.6	4.9	39.9	93.4
	6- ^{14}C	14.0	8.7	67.6	90.3
	$\frac{1-^{14}\text{C}}{6-^{14}\text{C}}$	1.14			
C.fimi ATCC 484	1- ^{14}C	5.9	8.3	75.2	89.4
	2- ^{14}C	5.2	9.5	82.9	97.6
	3,4- ^{14}C	14.7	5.1	78.1	97.9
	6- ^{14}C	4.2	10.6	75.3	90.1
	$\frac{1-^{14}\text{C}}{6-^{14}\text{C}}$	1.13			
C.flavigena ATCC 482	1- ^{14}C	3.5	39.1	51.9	94.5
	2- ^{14}C	3.4	39.5	48.4	91.3
	3,4- ^{14}C	10.2	50.6	32.6	93.4
	6- ^{14}C	2.0	41.5	51.6	95.1
	$\frac{1-^{14}\text{C}}{6-^{14}\text{C}}$	1.75			
C.gelida ATCC 488	1- ^{14}C	4.5	21.7	72.2	98.4
	2- ^{14}C	4.4	22.1	71.9	98.4
	3,4- ^{14}C	10.6	17.1	70.0	97.7
	6- ^{14}C	3.2	22.0	73.3	98.9
	$\frac{1-^{14}\text{C}}{6-^{14}\text{C}}$	1.4			
C.uda ATCC 491	1- ^{14}C	9.8	21.6	59.6	91.0
	2- ^{14}C	10.6	24.1	59.3	94.0
	3,4- ^{14}C	28.6	17.7	46.7	93.0
	6- ^{14}C	7.7	23.7	63.4	94.8
	$\frac{1-^{14}\text{C}}{6-^{14}\text{C}}$	1.3			

stehen. Da in unseren radiorespirometrischen Versuchen nur 3,4- ^{14}C -Glucose, nicht aber auch 3- ^{14}C und 4- ^{14}C -Glucose eingesetzt wurde, kann man nicht entscheiden, ob aus C-3 und C-4 der Glucose tatsächlich gleiche Mengen an CO_2 entstanden sind.

Es wurde daher mit *C. biazotea* ATCC 486 ein Versuch durchgeführt, bei dem auch 3- ^{14}C -Glucose angeboten wurde. Durch Differenzbildung der Werte $2 \times \text{CO}_2$ aus 3,4- ^{14}C -Glucose und CO_2 aus 3- ^{14}C -Glucose (jedes markierte Kohlenstoffatom der 3,4- ^{14}C -Glucose besitzt nur die Hälfte der spezifischen Aktivität wie das der 3- ^{14}C -Glucose) kann der Prozentsatz des aus C-4 der Glucose freigesetzten CO_2 errechnet werden. Tab. 8 zeigt das Ergebnis dieses Versuches

Tab.8: Vergleich der Aktivität im CO_2 bei Veratmung positionsmarkierter Glucose durch *C. biazotea* ATCC 486.

Ansatz: Phosphatpuffer 0.1 M, pH 6,5₆
 Markierte Glucosen: 1.2×10^6 Ipm
 Gasphase: Luft

Zeit: 2 Stunden

Werte in Prozent des eingesetzten ^{14}C . Der Wert für 4- ^{14}C -Glucose wurde durch Differenzbildung bestimmt.

	Glucose-					
	1- ^{14}C	2- ^{14}C	3- ^{14}C	3,4- ^{14}C	4- ^{14}C	6- ^{14}C
<i>C. biazotea</i> ATCC 486	18.6	19.6	47.1	52.0	56.9	15.8

Man erkennt, daß aus C-4 der Glucose ein etwas höherer Prozentsatz in CO_2 gelangt als aus C-3. Ein Vergleich mit Daten anderer Autoren zeigt, daß bei einem Abbau der Glucose über eine Kombination des EMP und des Hexose-Monophosphatwegs (HMP-Weg) CO_2 aus C-4 stets stärker markiert ist, als CO_2 aus C-3. (Zagallo und Wang, 1961, 1967; Wang und Krackov, 1962). Auf dieses Problem wird in Abschnitt 3.5.3.2. noch ausführlich eingegangen.

Eine Beteiligung des HMP-Weges kann man in dem Übergewicht der Markierung im CO_2 aus C-1 gegenüber der im CO_2 aus C-6 erkennen. CO_2 aus C-1 ist jedoch gegenüber dem aus C-6 nur unwesentlich stärker markiert. Der Quotient: CO_2 aus 1- ^{14}C -Glucose / CO_2 aus 6- ^{14}C -Glucose liegt zwischen 1.1 und 1.8. Bei Organismen, die einen großen Anteil der Glucose über den HMP-Weg abbauen, liegt der Quotient zwischen 2.5 und 3. Man kann bei den untersuchten Stämmen der Gattung *Cellulomonas* also auf eine höchstens geringe Beteiligung des HMP-Weges am Abbau der Glucose schließen. Die Markierung im CO_2 aus den Positionen 1, 2 und 6 der Glucose kann durch die Tätigkeit des TCC erklärt werden. Das bei der Spaltung des Pyruvats entstehende Acetyl-CoA gelangt in den TCC und unterliegt dort decarboxylierenden Reaktionen. Dabei hat das C-2 bzw. C-5 Atom der Glucose (Carboxylgruppe des Acetats) eine größere Chance als CO_2 freigesetzt zu werden, als das C-1 bzw. C-6 Atom der Glucose (Methylgruppe des Acetats). Denn je länger ein C-Atom im TCC verbleibt, desto größer ist seine Chance, als Zellmaterial festgelegt zu werden. Aus diesem Grund findet man im CO_2 aus C-6 weniger Markierung als im CO_2 aus C-2. Die tatsächlich beobachtete Überlegenheit von CO_2 aus C-1 der Glucose über CO_2 aus C-2 und C-6 der Glucose in fast allen Versuchen beruht, wie oben erwähnt, auf den decarboxylierenden Vorgängen im HMP-Weg.

3.1.2. Radiorespirometrie unter anaeroben Bedingungen

Die Versuchsanordnung ist die gleiche, wie sie unter 3.1.1. beschrieben wurde. Die Organismen wurden vor Versuchsbeginn mit N_2 begast. Die Versuchszeit wurde wegen der geringeren Glucoseverwertung auf 4 Std. ausgedehnt. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 zusammengefaßt.

Tab.9: Verteilung von ^{14}C nach der anaeroben Vergärung von positionsmarkierten Glucosen durch Cellulomonasstämmе.

Ansatz: Phosphatpuffer 0.1 M, pH 5.5

Markierte Glucosen: * = 1.8×10^6 Ipm,

Gasphase: N_2 ** = 5×10^6 Ipm.

Zeit: 4 Stunden

Werte in Prozent des eingesetzten ^{14}C .

Der Wert für 4- ^{14}C -Glucose wurde durch Differenzbildung bestimmt.

Stamm	Markierung	CO_2	Bakterien	Medium	Ausbeute in Prozent
C.biazotea* ATCC 486	1- ^{14}C	3.9	0.6	92.8	97.3
	2- ^{14}C	1.5	0.6	96.6	98.7
	3- ^{14}C	22.5	0.6	76.0	99.1
	3,4- ^{14}C	26.3	0.6	74.2	101.1
	4- ^{14}C	30.1	0.6	72.4	103.1
	6- ^{14}C	0.9	0.7	94.0	95.6
C.fimi** ATCC 484	1- ^{14}C	0.8	0.9	93.5	95.2
	2- ^{14}C	0.3	1.4	92.6	94.3
	3,4- ^{14}C	2.4	0.9	91.3	94.6
	6- ^{14}C	0.3	1.3	95.6	97.2

Auch hier gilt für die Anwesenheit von Markierung im Medium und in den Bakterien das unter 3.1.1. gesagte. Der Prozentsatz der Markierung in den Bakterien ist in diesem Versuch jedoch deutlich geringer als unter aeroben Bedingungen. Der Unterschied in der Menge des assimilierten ^{14}C unter den beiden verschiedenen Bedingungen kann auf die unterschiedlich starke Tätigkeit des TCC zurückgeführt werden. Während dem unter aeroben Bedingungen stark aktiven TCC ständig Zwischenprodukte zum Zellaufbau entzogen werden, werden anaerob nur in ganz geringem Ausmaß Pro-

dukte über den TCC abgebaut. Daher kann auch keine Assimilation von ^{14}C stattfinden.

Man erkennt aus den Werten von Tab. 9, daß kein grundsätzlicher Unterschied zu den Ergebnissen des aeroben Glucoseabbaus besteht. Wie man am deutlichsten im Falle von *C. biazotea* erkennt, wird aus C-3 und C-4 der Glucose am meisten CO_2 abgespalten, wobei auch unter diesen Bedingungen mehr Markierung aus C-4 als aus C-3 der Glucose in CO_2 gelangt. Da bei Abwesenheit von Sauerstoff der TCC nur schwach abläuft, wird aus den Seitenpositionen der Glucose vorwiegend durch den HMP-Weg CO_2 freigesetzt, wodurch sich das stärkere Übergewicht von $^{14}\text{CO}_2$ aus C-1 gegenüber dem aus C-2 und C-6 erklärt.

Die Ergebnisse mit *C. fimi* ATCC 484 ähneln denen, die mit *C. biazotea* erzielt wurden, wenn auch die CO_2 -Produktion, vor allem aus den Positionen 3 und 4 der Glucose, deutlich geringer ist.

3.2. Verteilung der Markierung auf die Endprodukte bei Vergärung positionsmarkierter Glucose

Aus den Ergebnissen der Radiorespirometrie wurde geschlossen, daß die Organismen Glucose zum größten Teil über den EMP-Weg und nur zu einem sehr geringen Teil über den HMP-Weg abbauen. Eine Bestätigung dieser Annahme muß durch die Analyse der Verteilung der Markierung auf die Endprodukte nach Vergärung positionsmarkierter Glucose erbracht werden.

Die Versuche wurden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, da dabei die Menge an Gärprodukten höher ist.

Tab. 10.1 zeigt das mit *C. fimi* ATCC 484 erzielte Ergebnis. Die Versuche wurden im Puffer mit 2 verschiedenen pH-Werten ausgeführt. Die Markierung im CO_2 und den neutralen, flüchtigen Substanzen wurde nicht ermittelt. Bei beiden pH-Werten ist Acetat aus C-1 und C-6 Glucose gleich hoch markiert. Dagegen ist die Markierung des Lactats ungleich. Man erkennt außerdem,

Tab. 10: Verteilung der Markierung auf die Gärprodukte bei der anaeroben Vergärung von positionsmarkierter Glucose.

Ansatz: Phosphatpuffer 0.1 M, pH 5.5
Markierte Glucose : * = 7.5×10^5 Ipm, ** = 1.8×10^6 Ipm

Zeit: 2 Stunden

Werte in Prozent der Gesamtmarkierung der Produkte.

10.1 C. fimi* ATCC 484	Glucose-					
	1- ¹⁴ C	3,4- ¹⁴ C	6- ¹⁴ C	1- ¹⁴ C	3,4- ¹⁴ C	6- ¹⁴ C
	pH 5.5			pH 6.5		
Formiat	3.9	51.0	2.2	6.1	68.8	2.7
Acetat	83.5	27.1	80.0	81.6	15.6	82.6
Lactat	12.1	18.1	17.8	10.2	11.9	14.7
Succinat	0.5	3.8	0.0	2.1	3.7	0.0

10.2 C. biazorella** ATCC 486	Glucose-					
	1- ¹⁴ C	2- ¹⁴ C	3- ¹⁴ C	3,4- ¹⁴ C	6- ¹⁴ C	
CO ₂	4.9	1.9	28.6	33.5	1.3	
Formiat	1.5	1.2	9.1	11.2	1.8	
Acetat	21.2	24.6	12.7	5.6	15.6	
Äthanol	32.0	31.7	7.5	6.5	31.6	
Lactat	33.0	39.2	40.0	41.3	48.1	
Succinat	1.4	1.4	2.1	1.9	1.6	

daß Formiat vorwiegend aus den Positionen 3,4 der Glucose stammt, was für eine phosphoroklastische Spaltung von Pyruvat spricht, worauf schon früher hingewiesen wurde (2.3.). Der Einfluß des höheren pH-Wertes macht sich, wie erwartet, in einer vermehrten Bildung von Formiat bemerkbar. Bei *C.biazotea* ATCC 486 wurden zusätzlich noch Äthanol und CO_2 bestimmt. (Tab.10.2)

Die C_1 -Stücke CO_2 und Formiat entstehen, wie es dem Abbau der Glucose über die Glycolyse entspricht, fast ausschließlich aus den Positionen 3 und 4 der Glucose. Da CO_2 in Kalilauge abgefangen wurde, hätte sich die Anwesenheit weiterer Gase, z.B. H_2 , durch Druckzunahme am Manometer bemerkbar machen müssen. Eine Druckzunahme wurde jedoch nie beobachtet. Man kann daher annehmen, daß keine Spaltung von Formiat in CO_2 und H_2 stattfindet. Das C_3 -Stück, Lactat, enthält von allen Positionen der Glucose etwa gleich viel Markierung, mit einer schwachen Benachteiligung der Positionen 1, 2 und 3. Die C_2 -Stücke Äthanol und Acetat entstehen im wesentlichen aus den Positionen 1,2 und 5,6. (Der Anteil von C_1 -Stücken aus 5- ^{14}C -Glucose wurde geschätzt.) Diese Markierungsverteilung spricht für eine symmetrische Zerlegung des Glucosemoleküls, wie man sie bei einem Abbau der Glucose über den EMP-Weg erwartet. Überraschend ist jedoch der Befund, daß sowohl bei *C.fimi* als auch bei *C.biazotea* ein hoher Prozentsatz der Markierung aus den Positionen 3 und 4 der Glucose gefunden wird. Geht man davon aus, daß Acetat sowohl aus C-3, als auch aus C-4 Markierung erhält, so muß, wie schon erwähnt, auf Grund der geringeren spezifischen Aktivität der Kohlenstoffatome der C-3,4 markierten Glucose gegenüber der C-3 markierten Glucose (bei Einsatz gleicher molarer spezifischer Aktivität), das Acetat aus 3,4- ^{14}C -Glucose mehr als halb so stark markiert sein, wie das aus 3- ^{14}C -Glucose. Bei den Werten der Tab.10.2 trifft das für Äthanol, nicht jedoch für Acetat zu. Daraus folgert, daß Äthanol sowohl aus C-3 als auch aus C-4, Acetat jedoch nur aus C-3 der Glucose entstanden ist. Wie weiter unten

beschriebene Versuche zeigen (Tab.17, Tab.24a) ergibt sich aber auch aus Position 4 der Glucose eine deutliche Acetatbildung.

Die Acetatbildung aus den Positionen 3 und 4 der Glucose widerspricht einem Abbau der Glucose über die Glycolyse, da bei diesem Weg gerade diese Positionen als C-1 Stücke freigesetzt werden, oder in Lactat eingehen sollten.

Eine weitere Abweichung von den Werten, die man bei einem Abbau von markierter Glucose über die Glycolyse erwartet, erkennt man bei einem Vergleich der Markierung der C_1 mit der der C_2 -Stücke (Tab.10.2), die gleich hoch sein sollte. Bei einem Abbau von positionsmarkierten Glucosen über den EMP-Weg entstehen aus 1- ^{14}C - und 6- ^{14}C -Glucose methylnmarkierte, und aus 2- ^{14}C und 5- ^{14}C -Glucose carboxylmarkierte C_2 -Stücke. Nach Einsatz von 3,4- ^{14}C -Glucose werden ausschließlich markierte C_1 -Stücke gebildet. Die aus 3- ^{14}C -Glucose entstandenen C_1 -Stücke und die aus 1- ^{14}C - bzw. 2- ^{14}C -Glucose entstandenen C_2 -Stücke müßten bei Verwendung von Glucosen gleicher spezifischer Aktivität, gleich hohe Markierung tragen.

Bei unseren Überlegungen kann man sinnvollerweise nur die aus 2- ^{14}C -Glucose entstandenen C_2 -Stücke mit denen aus 3- ^{14}C -Glucose entstandenen C_1 -Stücke vergleichen. Die aus 1- ^{14}C -Glucose entstandenen C_2 -Stücke sind für einen Vergleich nicht geeignet, da wegen der Freisetzung eines Teils der markierten C-Atome als $^{14}CO_2$ durch die Decarboxylierung im HMP-Weg, Markierung verlorengeht.

Vergleicht man die Werte der aus 2- ^{14}C -Glucose entstandenen C_2 -Stücke mit denen der aus 3- ^{14}C -Glucose entstandenen C_1 -Stücke (Tab.10.2), so ergibt sich eine Differenz von 19.1 %. Nur wenn man annimmt, daß es sich bei den 20 % Markierung, die in den aus 3- ^{14}C -Glucose entstandenen C_2 -Stücken auftritt, in Wirklichkeit um C_1 -Stücke handelt, geht die Bilanz zwischen den C_1 - und C_2 -Stücken auf.

Dies kann folgendes bedeuten: 1. Im Laufe des Stoffwechsels sind markierte C_1 -Stücke zu markierten C_2 -Stücken kondensiert worden. 2. In der Zelle läuft neben dem EMP-Weg noch ein anderer Abbauweg ab, über den Pyruvat entsteht, das seine Carboxylgruppe nicht von C-3 der Glucose erhält, wie z.B. bei dem Entner-Doudoroff-Weg. 3. Vor ihrem Abbau unterliegt die Hexose umgruppierenden Reaktionen, die eine Verschmierung der Markierung innerhalb des Moleküls bewirken.

Da die Bestimmung der Markierungsverteilung innerhalb der Endprodukte einen Hinweis auf ihren Bildungsmechanismus geben können, wurde diese chemisch abgebaut und die Verteilung bestimmt.

3.3. Bestimmung der Markierungsverteilung in den Endprodukten

3.3.1. Markierungsverteilung im Acetat und Äthanol

Die Markierung in der Carboxylgruppe (C-1) des Acetats wurde direkt bestimmt, die in der Methylgruppe (C-2) wurde durch Differenzbildung der Werte der Gesamtmarkierung im Acetat und der Markierung in der Carboxylgruppe ermittelt.

Wie Tab. 11 zeigt, ist bei *C.biazotea* ATCC 486 und *C.fimi* ATCC 484 die Markierungsverteilung im Acetat aus den Positionen 1, 2 und 6 der Glucose so beschaffen, wie man es bei einem Abbau der Glucose über die Glycolyse erwartet: Acetat aus $1-^{14}C$ - und $6-^{14}C$ -Glucose ist fast ausschließlich in der Methylgruppe markiert, während Acetat aus $2-^{14}C$ -Glucose carboxylmarkiert ist. Bei Acetat und Äthanol aus der Vergärung von $3-^{14}C$ -Glucose durch *C.biazotea* ist die Carboxylgruppe stärker markiert als die Methylgruppe. Bei der Vergärung von $3,4-^{14}C$ -Glucose durch *C.biazotea* liegt nahezu Gleichverteilung vor.

3.3.2. Markierungsverteilung im Lactat

Zur Bestimmung der Markierungsverteilung wurde einerseits die Aktivität der Carboxylgruppe (C-1) und andererseits die der

Tab. 11: Prozentuale Verteilung der Markierung in Acetat und Äthanol bei Vergärung positionsmarkierter Glucose

Organismus	Produkt	Glucose-					
		1- ¹⁴ C	2- ¹⁴ C	3- ¹⁴ C	3,4- ¹⁴ C	6- ¹⁴ C	
C.biazotea* ATCC 486	Acetat						
	C-1	3.5	97.9	70.2	57.8	3.4	
	C-2	96.5	2.1	29.8	42.2	96.6	
	Äthanol						
	C-1	x	x	70.2	45.7	x	
	C-2			29.8	54.3		
C.fimi** ATCC 484	Acetat						
	C-1	5.5	99.0	x	32.5	2.1	
	C-2	94.5	1.0		67.5	97.9	

* = Die Produkte stammen aus dem Versuch, der in Tabelle 10.2. aufgeführt ist.

** = Die Produkte wurden aus dem Überstand des unter anaeroben Bedingungen durchgeführten, radiorespirometrischen Versuchs isoliert.

x = nicht untersucht.

Hydroxylmethyl- und Methylgruppe gemeinsam (C-2 + C-3) gemessen.

Die Ergebnisse sind in Tab. 12 zusammengefaßt:

Bei einem Abbau der Glucose über die Glycolyse erwartet man aus 1-¹⁴C und 6-¹⁴C-Glucose ausschließlich methylmarkiertes, aus 2-¹⁴C- und 5-¹⁴C-Glucose nur hydroxymethylmarkiertes und aus 3-¹⁴C- und 4-¹⁴C-Glucose nur carboxylmarkiertes Lactat. Entgegen der Erwartung ist die Carboxylgruppe des Lactats auch bei Vergärung von 1-¹⁴C, 2-¹⁴C- und 6-¹⁴C-Glucose markiert. Umgekehrt tragen die C-Atome 2 und 3 des bei der Vergärung von 3-¹⁴C- und 3,4-¹⁴C-Glucose entstandenen Lactats entgegen den Erwartungen eine relativ starke Markierung. Das Auftreten von Markierung in der Carboxylgruppe des Lactats aus 1-¹⁴C-, 2-¹⁴C- und 6-¹⁴C-Glucose könnte auf einem methodischen Fehler beruhen, demnach den Angaben von Simon und Floss können bei der von uns verwendeten Methode der Decarboxylierung des Lactats bis zu 10 % der C₂-Stücke ebenfalls oxydiert werden und täuschen dann Markierung in der Carboxylgruppe vor. Nach unseren eigenen Erfahrungen ist diese Angabe jedoch zu hoch. Der Fehler bewegt sich nur zwischen 3 und 5 %. Das Auftreten von 10 bis 20 % Markierung in den genannten Carboxylgruppen kann daher nicht methodisch begründet sein. Die durch die Abbaumethode hervorgerufene, scheinbare Markierungsverteilung könnte auch keine Erklärung für die Anwesenheit von etwa 10 % Markierung in C-2 und C-3 des Lactats aus 3-¹⁴C- und 3,4-¹⁴C-Glucose geben, da bei einem spezifisch in der Carboxylgruppe markiertem Lactat bei der Oxydation kein markiertes Acetat entstehen kann.

3.4. Bildung markierten Acetats aus 3,4-¹⁴C-Glucose

Um zu prüfen, ob das ungewöhnliche Auftreten doppeltmarkierter C₂-Stücke aus 3,4-¹⁴C-Glucose nur auf die Gattung Cellulomonas beschränkt ist, wurden neben 4 weiteren Stämmen dieser Gattung auch 4 Stämme aus drei verschiedenen Familien auf dieses Phänomen hin untersucht. Dazu wurden Stämme herangezogen,

Tab.12: Prozentuale Verteilung der Markierung im Lactat bei Vergärung positionsmarkierter Glucose

Organismus	Lactat	Glucose-				
		1- ¹⁴ C	2- ¹⁴ C	3- ¹⁴ C	3,4- ¹⁴ C	6- ¹⁴ C
C.biazotea** ATCC 486	C-1 C-2 + C-3	17.9	16.9	86.8	89.5	5.9
		82.1	83.1	13.2	10.5	94.1
C.fimi* ATCC 484	C-1 C-2 + C-3	20.5	18.8	x	89.5	10.5
		79.5	81.2		10.5	89.5
C.gelida** ATCC 488	C-1 C-2 + C-3	10.5	8.1	x	90.3	5.6
		89.5	91.9		9.7	94.4

* = Das Lactat stammt aus dem Versuch, dessen Ergebnisse in Tab. 10 aufgeführt sind.

** = Das Lactat wurde nach einem Versuch isoliert, dessen Bedingungen denen unter * aufgeführten Bedingungen glich.

x = nicht untersucht

von denen bekannt war, daß sie Glucose über die Glycolyse abbauen und Acetat bilden.

Aus der Familie Corynebacteriaceae wurden *C.callunae* und *Microbacterium lacticum*, aus der Familie Micrococcaceae *Staphylococcus aureus* und aus der Familie Enterobacteriaceae *Escherichia coli* ausgewählt.

Alle Versuche wurden unter den gleichen Bedingungen im Puffer durchgeführt, wie sie bisher bei den beiden untersuchten *Cellulomonas*-stämmen angewendet wurden. Die Ergebnisse sind in Tab. 13 und 15 zusammengefaßt.

Tab.13: Verteilung der Markierung auf die Gärprodukte bei der anaeroben Vergärung von 3,4-¹⁴C-Glucose durch verschiedene *Cellulomonas*-stämmen.

Ansatz: Phosphatpuffer pH 5.5, 0.1 M
Markierte Glucose: 9×10^5 Ipm
Gasphase: N₂

Zeit: 7 Stunden

Werte in Prozent der Gesamtmarkierung der Produkte.

Produkte	Stamm			
	<i>C.flavi- gena</i> ATCC 482	<i>C.gelida</i> ATCC 488	<i>C.sub- albus</i> NCIB 8075	<i>C.uda</i> ATCC 491
CO ₂	0.6	1.1	0.6	1.1
Formiat	10.6	26.4	22.5	48.0
Acetat	5.5	3.0	0.0	5.9
Äthanol	1.7	1.9	0.5	2.2
Lactat	77.0	64.6	65.1	36.6
Succinat	4.6	3.0	11.3	6.2

Aus Tab. 13 geht hervor, daß auch diese 4 Stämme der Gattung *Cellulomonas* die gleichen Produkte bilden, wie *C.biazotea* und *C.fimi*. Auch bei *C.flavigena*, *C.gelida*, *C.subalbus* und *C.uda* sind Lactat und Formiat bei der Vergärung 3,4-¹⁴C-Glucose im

Puffer unter leicht sauren Bedingungen am stärksten markiert. Succinat ist wahrscheinlich deswegen stärker als bei den anderen Versuchen markiert, da die Versuchszeit verdoppelt wurde.

Mit Ausnahme von *C. subalbus*, bei dem nur Spuren von markiertem Äthanol und kein markiertes Acetat gefunden wurden, bilden die anderen 3 Stämme deutlich sowohl markiertes Äthanol, als auch markiertes Acetat. Der Abbau des Acetats (Tab.14) zeigt, daß auch bei diesen Stämmen beide C-Atome markiert sind.

Tab.14: Prozentuale Verteilung der Markierung im Acetat* bei Vergärung 3,4-¹⁴C-Glucose durch Stämme der Gattung *Cellulomonas*.

Organismus	<i>C. flavigena</i> ATCC 482	<i>C. gelida</i> ATCC 488	<i>C. uda</i> ATCC 491
Acetat			
C-1	48.7	28.5	57.2
C-2	51.3	71.5	42.8

* = Das Acetat stammt aus dem Versuch, dessen Ergebnisse in Tab. 13 aufgeführt sind.

Dagegen wird bei den Stämmen, die zum Vergleich zu den *Cellulomonas*-Stämmen herangezogen wurden, überhaupt kein oder nur außerordentlich niedrig markiertes Acetat gefunden (Tab. 15). Das zeigt, daß das Auftreten doppelt markierter C₂-Stücke nach glycolytischem Abbau der Glucose bei den *Cellulomonas*-Stämmen eine Besonderheit ist.

Tab.15: Bildung markierten Acetats bei der anaeroben Vergärung positionsmarkierter Glucosen durch verschiedene Bakterienstämme.

Ansatz: Phosphatpuffer 0.1 M, pH 5.5
 Markierte Glucose : 8×10^5 Ipm
 Gasphase: N_2

Zeit: 4 Stunden

Werte in Prozent der Gesamtmarkierung der Produkte*

Stamm	Glucose-		
	1- ^{14}C	3,4- ^{14}C	6- ^{14}C
Corynebacterium callunae ATCC 15991	3.6	0.0	5.0
Microbacterium lacticum Lechevalier 630	3.3	0.0	3.1
Staphylococcus aureus Stamm H	5.4	0.1	5.6
Escherichia coli ATCC 11775	31.2	0.2	40.7

* = Neben der Markierung im Acetat wurde noch die in CO_2 , Formiat, Lactat und Succinat bestimmt.

3.5. Überlegungen, auf welchem Weg markiertes Acetat aus 3,4- ^{14}C -Glucose entstehen kann

Für die Bildung markierten Acetats aus 3,4- ^{14}C -Glucose gibt es folgende Erklärungsmöglichkeiten :

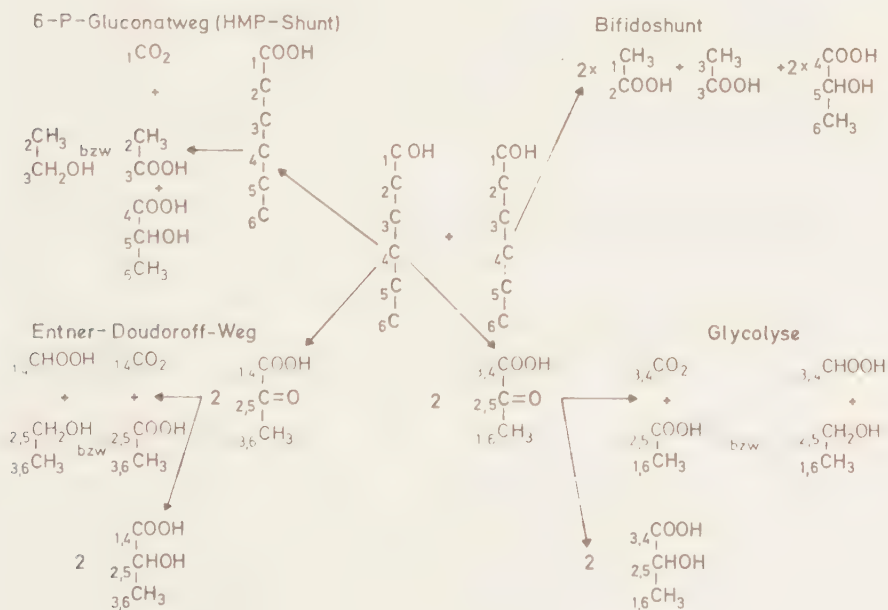
1. Im Verlauf des Glucoseabbaues über den 6-P-Gluconatweg, den Entner-Doudoroff-Weg oder den Bifidoshunt.
2. Durch eine De Novo-Synthese aus CO_2 , das aus den Positionen 3 und 4 der Glucose entsteht. Dieser Mechanismus findet in manchen Clostridienstämmen statt.

3. Durch Umbau des Kohlenstoffskeletts der Glucose vor dem glycolytischen Abbau zu Pyruvat.

3.5.1. Bildung von markiertem Acetat im Verlauf des Glucose- abbaues.

In Abb. 3 sind die 3 Wege dargestellt, auf denen Acetat-
bildung aus den mittleren Positionen der Glucose stattfindet.
Zum Vergleich ist auch die Markierungsverteilung in den End-
produkten aufgezeichnet, die über die Glycolyse entstehen.

Abb.3: Schema der Verteilung der einzelnen Kohlenstoffatome
der Glucose auf die Gärungsprodukte bei den verschie-
denen Abbauegen.



3.5.1.1. 6-P-Gluconatweg

Bei diesem Weg, der vor allem innerhalb der Familie Lactobacillaceae von den Betabakterien zum Abbau der Glucose benutzt wird, findet als erster Schritt eine Oxydation von Glucose-6-P zu 6-P-Gluconat statt. Dieses Produkt wird durch eine Dehydrogenase in CO_2 und Ribulose-5-P gespalten. Nach Umwandlung in Xylulose-5-P werden mit Hilfe einer Phosphoketolase C-2 und C-3 der ursprünglichen Glucose als Acetyl-P abgespalten, das von einigen Stämmen zu Acetat, von anderen zu Äthanol umgewandelt wird. Der untere Teil der Pentose, eine Triose, wird in den meisten Fällen zu Lactat reduziert.

Die Carboxylgruppe des Acetats bzw. die Carbinolgruppe des Äthanols wird von C-3 der verwerteten Glucose gebildet, während die Methylgruppe bei beiden Produkten von C-2 der Glucose stammt. Gegen eine Beteiligung dieses Weges am Abbau der Glucose bei den Cellulomonasstämmen sprechen folgende Tatsachen :

- a) Den markierten C_2 -Stücken aus 3,4- ^{14}C -Glucose stehen nicht die entsprechenden C_1 -Stücke aus 1- ^{14}C -Glucose gegenüber.
- b) Bei Vergärung von 3- ^{14}C -Glucose werden keine doppelt markierten C_2 -Stücke gebildet.
- c) C-4 der Glucose ist nicht an der Bildung der C_2 -Stücke beteiligt.

3.5.1.2. Entner-Doudoroff-Weg

Bei diesem Weg wird die Glucose über Glucose-6-P zu 6-P-Gluconsäure oxydiert, die von einer Dehydratase in 2-keto-3-desoxy-6-P-Gluconsäure überführt wird. Durch die KDPG-Aldolase entstehen aus den Positionen 1, 2 und 3 der Glucose Pyruvat und

aus den Positionen 4,5 und 6 3-P-Glycerinaldehyd, das ebenfalls zu Pyruvat oxydiert wird. Im Unterschied zu dem Pyruvat, das über den EMP-Weg gebildet wird, besteht die Carboxylgruppe aus C-1 und C-4 der Glucose. Wird Pyruvat decarboxyliert, entsteht also aus den Positionen 1 und 4 CO_2 bzw. Formiat, während Acetat bzw. Äthanol von C-2 und C-3 bzw. C-5 und C-6 stammen. Bei Einsatz 3,4- ^{14}C -Glucose entsteht entweder aus C-3 methylmarkiertes Acetat und aus C-4 CO_2 , oder es werden zu 50 % methylmarkiertes und zu 50 % carboxylmarkiertes Lactat gebildet. Gegen die Beteiligung dieses Abbauweges sprechen folgende Befunde :

- a) C-4 ist nicht an der Bildung von Acetat bzw. Äthanol beteiligt.
- b) Aus C-3 entsteht nur methylmarkiertes, aber kein doppeltmarkiertes Acetat.
- c) Aus 1- ^{14}C -Glucose kann zwar carboxylmarkiertes und aus 3- ^{14}C -Glucose methylmarkiertes Lactat entstehen, aber die bei *Cellulomonas* gefundene Impulsverteilung im Lactat aus 2- ^{14}C -, 4- ^{14}C - und 6- ^{14}C -Glucose findet durch diesen Weg keine Erklärung.
- d) Den markierten C_2 -Stücken aus 3- ^{14}C -Glucose stehen nicht die äquivalenten Mengen C_1 -Stücke aus 1- ^{14}C -Glucose gegenüber.

Eine weitere Möglichkeit, die Beteiligung des ED-Weges zu prüfen, ist der Nachweis der spezifischen Enzyme dieses Weges, nämlich der Phosphogluconat-Dehydratase und der Phospho-2-keto-3-desoxy-Gluconat-Aldolase. Aus 6-P-Gluconat wird bei Anwesenheit dieser Enzyme im Rohextrakt Pyruvat gebildet, das in einem von Kersters und De Ley (1968 b) ausgearbeiteten Schnelltest nachgewiesen werden kann. Als Versuchsstämme wurden *C. flavigena* ATCC 482 und *C. biazotea* ATCC 486 herangezogen. *C. flavigena* wurde, da es Gluconat verwertet, in einem Hefe-Gluconat-Medium

angezogen, während *C. biazotea*, bei dem keine Verwertung dieser Substanz nachgewiesen werden konnte, in HD-Medium kultiviert wurde. Als positiver Vergleichsstamm wurde *E. coli* ATCC 11775 herangezogen, der in einem Hefe-Gluconat-Medium kultiviert wurde. Nur bei *E. coli*, nicht dagegen bei den beiden *Cellulomonas*-stämmen, konnte die Pyruvatbildung aus 6-P-Gluconat nachgewiesen werden.

Sowohl durch die Versuche mit markierter Glucose, als auch wegen des Fehlens der Schlüsselenzyme dieses Weges, kann eine Beteiligung des ED-Weges am Abbau der Glucose bei den Stämmen der Gattung *Cellulomonas* ausgeschlossen werden.

3.5.1.3. Bifidoweg

Innerhalb der Gattung *Bifidobacterium* wird die Glucose über folgenden Mechanismus abgebaut: Fructose-6-P wird durch eine spezifische Hexose-Phosphoketolase in Acetyl-P und Erythrose-4-P gespalten. Erythrose-4-P dient als Akzeptor für eine Triose, die durch eine Transaldolasereaktion aus einem zweiten Molekül Fructose-6-P bereitgestellt wird. Das entstehende Molekül Sedoheptulose-7-P und das Triose-P, das aus dem unteren Teil des zweiten Hexosemoleküls stammt, werden durch eine Transketolasereaktion in 2 Moleküle Pentose-P umgewandelt. Diese Pentose-P werden mit Hilfe einer Phosphoketolase in zwei Moleküle Acetyl-P und Triose-P gespalten. Während Acetyl-P in Acetat umgewandelt wird, können die Triose-P unter Bildung von Fructose-1,6-di-P kondensieren, so daß, wie bei *Acetobacter xylinum* (Schramm et al. 1958) als Endprodukt ausschließlich Acetat entsteht, oder die Triose-P werden, wie bei den Bifidobakterien (Scardovi et al. 1965), in Pyruvat überführt, das dann zu Lactat reduziert wird. Wie aus Abbildung 3 zu sehen ist, wird Lactat nur aus den unteren 3 C-Atomen der Glucose gebildet. 2 Moleküle Acetat entstehen aus den Positionen C-1 und C-2, das 3. Molekül dagegen nur aus der C-3 Position. Folgende Tatsachen sprechen gegen die Beteiligung dieses Weges an der Bildung markierten Acetats bei den *Cellulomonas*-stämmen :

- a) Im Gegensatz zu den Bifidobakterien ist bei den Cellulomonasstämmen C-4 der Glucose an der Bildung von C_2 -Stücken beteiligt.
- b) Aus $3\text{-}^{14}C$ -Glucose entsteht Acetat, das nicht in beiden C-Atomen gleich markiert ist, wie es der Bifidoweg verlangt.
- c) Alle Versuche, im Rohextrakt aerob gezogener Zellen von C. biazotea ATCC 486 die Anwesenheit des Schlüsselenzyms des Bifidoweges, der Fructose-6-P-Phosphoketolase, nachzuweisen, schlugen fehl.

3.5.2. Bildung von Acetat durch Refixierung von C_1 -Stücken

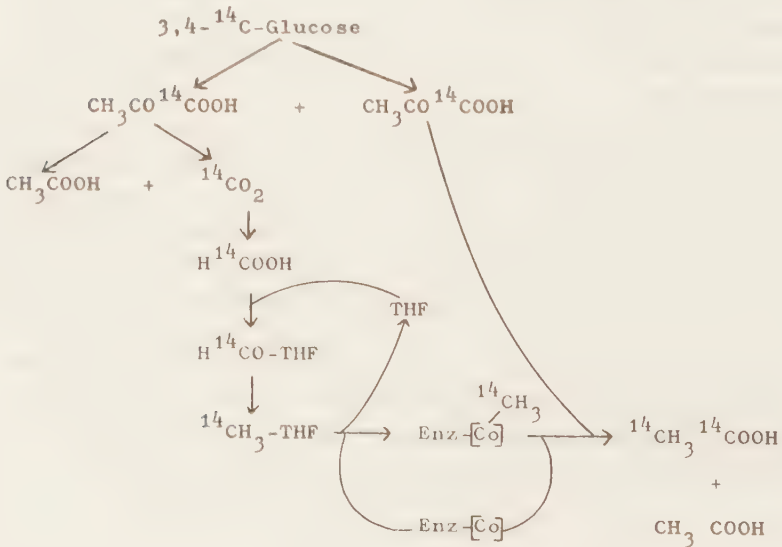
Schon 1936 beschrieb Wieringa einen Organismus, Clostridium aceticum, der CO_2 aus Acetat zu bilden vermochte. In Gegenwart von Wasserstoff wurde von diesem Stamm CO_2 zu Acetat reduziert. Es handelte sich aber bei diesem Bakterium nicht um einen chemoautotrophen Organismus, da es zum Wachstum organische Kohlenstoffquellen und Vitamine benötigte. Dieser Stamm ging jedoch verloren und stand damit weiteren Untersuchungen über den Mechanismus der Acetatbildung nicht mehr zur Verfügung.

Fontain beschrieb 1942 Clostridium thermoaceticum, das 1 Mol Glucose zu 3 Mol Acetat vergor, wobei allerdings keine Nettofixierung von CO_2 beobachtet wurde. Dieser Gärungstyp ist in der Literatur als Homoacetatgärung beschrieben. Der Mechanismus, der aus einem C_6 -Körper zu 3 C_2 -Stücken führt, ist nicht mit einem Abbau der Glucose über die Glycolyse und Spaltung in 2 Dreierstücke vereinbar. Barker und Kamen (1945) fanden jedoch, daß dieser Stamm bis zur Bildung von Pyruvat den EMP-Weg benützt und daß Pyruvat in Acetat und CO_2 gespalten wird. Dieses CO_2 wird letztlich vollständig zur Neosynthese von Acetat verwendet, wie vor allem durch den Arbeitskreis von

Ljungdahl und Wood (s.1969) gezeigt werden konnte. Sowohl bei *Clostridium thermoaceticum*, als auch bei *Clostridium aceticum* läuft bei der Acetatbildung aus CO_2 der gleiche Mechanismus ab. Es handelt sich also, wie bei den etwas problematischen Beobachtungen von Wieringa, um eine De Novo-Synthese aus CO_2 . Da aber nur das aus der Glucose entstandene CO_2 refixiert wird und keine Nettofixierung von exogenem CO_2 erfolgte, war dieser Vorgang nicht aus der Gärungsbilanz, sondern erst aus der Isotopenbilanz erkennbar.

Die Fähigkeit, CO_2 in Acetat zu fixieren ist inzwischen bei einer Reihe von Organismen gefunden worden. Dies sind neben einigen Stämmen der Gattung *Clostridium* auch *Butyribacterium rettgeri* und *Diplococcus glycinophilus* (s.Schulman et al., 1972). Abb. 4 zeigt den Verlauf der Acetatbildung aus CO_2 bei *Clostridium thermoaceticum*.

Abb.4: Schematische Darstellung der Totalsynthese von Acetat bei *Cl.thermoaceticum*.
Nach Schulman et al. (1973).



Bei dem glycolytischen Abbau der Glucose wird die Carboxylgruppe des Pyruvats zu CO_2 , die α - und β -Kohlenstoffatome zu Acetat. CO_2 wird mit Hilfe einer NADP-abhängigen Dehydrogenase zu Formiat reduziert, das dann, gebunden an Tetrahydrofolsäure, als N^{10} Formyl-THF zu N^5N^{10} Methenyl-THF umgewandelt wird. Dieses Produkt unterliegt zwei Reduktionsschritten, wobei über N^5N^{10} Methylen-THF, N^5 Methyl-THF gebildet wird. Die Methylgruppe wird mit Hilfe einer Transmethylierung auf einen Enzym-Corrinoid-Komplex übertragen, wobei Methyl-Cobalamin gebildet wird. Durch einen heute noch nicht völlig aufgeklärten Mechanismus wird durch Carboxylierung Acetat gebildet. Als Donor für die Carboxylgruppe dient nicht freies CO_2 , sondern die Carboxylgruppe einer α -Ketosäure, Pyruvat bzw. α -Ketoglutar säure, wie Schulman et al. (1973) unlängst nachwiesen.

Unsere Ergebnisse ähneln in folgenden Punkten denen von *Clostridium thermoaceticum* :

1. Der Abbau der Glucose erfolgt über die Glycolyse
2. Bei der Vergärung 3,4- ^{14}C -Glucose wird doppelt markiertes Acetat gebildet.
3. Acetat, das aus 3- ^{14}C -Glucose entsteht, besitzt ein Übergewicht in der Markierung in der Carboxylgruppe gegenüber der in der Methylgruppe.

Um zu prüfen, ob doppelt markiertes Acetat bei den Cellulomonasstämmen nach dem gleichen Prinzip gebildet wird wie bei den Clostridien, haben wir die bei den Clostridien bekannte Abhängigkeit der Acetatbildung von verschiedenen Faktoren auch bei unseren Stämmen untersucht.

3.5.2.1. Einfluß von unmarkiertem Formiat und Bicarbonat auf die Bildung von Acetat und dessen intramolekulare Markierungsverteilung bei Vergärung von 3,4- ^{14}C -Glucose.

Wood (1952) stellte fest, daß sich in Gegenwart von unmarkiertem CO_2 , das bei der Vergärung von 3,4- ^{14}C -Glucose entstehende $^{14}\text{CO}_2$

mit dem unmarkierten CO_2 vermischte, so daß sich Acetat mit geringerer spezifischer Aktivität in beiden C-Atomen bildete als im Versuch ohne CO_2 in der Atmosphäre. Eine Verringerung der spezifischen Aktivität im Acetat wurde außerdem durch die Anwesenheit von unmarkiertem Formiat im Reaktionspuffer bei Vergärung 3,4- ^{14}C -Glucose hervorgerufen.

Zur Überprüfung des Einflusses von C_1 -Verbindungen wurde *C. biazotea* ATCC 486 mit 3,4- ^{14}C -Glucose in Gegenwart von Formiat und/oder Bicarbonat in Puffer bei zwei verschiedenen pH-Werten anaerob inkubiert. Zur Kontrolle wurden Versuche ohne Zusatz, aber mit und ohne Adsorption des entstehenden markierten CO_2 durchgeführt. Nach Versuchsende wurde die Markierung in den Säuren bestimmt. (Alkohol wurde nicht untersucht.) Tab. 16 zeigt, daß weder bei pH 5.5, noch bei pH 6.5 eine Verdünnung der Markierung des Acetats eintritt. Man kann daraus schließen, daß entweder die Acetatbildung nicht über freie C_1 -Stücke erfolgt, oder daß die C_1 -Stücke zumindest nicht in einen gemeinsamen Pool mit den unmarkierten C_1 -Stücken gelangen, sondern sofort zur Acetatsynthese benutzt werden. Für die erste Hypothese spricht, daß es für die Acetatbildung keine Rolle spielt, wie hoch der CO_2 -Partialdruck im Versuchsgefäß ist, denn mit (Versuch ohne KOH, Spalte 1 und 2) und ohne (Versuch mit KOH, Spalte 3 und 4) Entfernung des bei der Gärung entstehenden CO_2 ist die Markierung im Acetat gleich hoch und auch die Zugabe von Bicarbonat führt zu keiner Verdünnung. Der einzig signifikante Unterschied, der sich bei Zusatz von Formiat und Bicarbonat ergibt, ist der relativ hohe Wert von 10.2 % für markiertes Formiat bei pH 5.5 (Spalte 7), während er in allen anderen Fällen bei pH 5.5 um 3.0 liegt. Dieser Effekt ist jedoch durch die ungenügende Pufferung des Mediums, dessen pH-Wert durch die Zugabe von Bicarbonat von 5.5 auf 6.0 verschoben wurde, bedingt. Bei diesem pH-Wert wird die Bildung von Formiat gegenüber der bei niedrigerem pH-Wert begünstigt.

Tab. 16: Verteilung der Markierung auf die Endprodukte bei der anaeroben Vergärung $3,4-^{14}\text{C}$ -Glucose durch *C. biazotea* ATCC 486 in Gegenwart unmarkierter C1-Stücke.

Ansatz: Phosphatpuffer 0.1 M, pH 5.5
 Markierte Glucose : 5.7×10^5 Ipm
 Gasphase : N_2

Zeit: 4 Stunden

Werte in Prozent des eingesetzten ^{14}C

Bedingungen und Produkte	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	5.5	6.5	5.5	6.5	5.5	6.5	5.5	6.5
KOH im Reaktionsgefäß	+	+	-	-	-	-	(6.0)	(6.8)
HCOOH 5 μM	-	-	-	-	+	+	+	+
Na_2CO_3 5 μM	-	-	-	-	-	-	+	+
CO_2	11.9	21.8	-	-	-	-	-	-
Formiat	2.6	31.5	2.7	33.4	3.2	32.6	10.2	33.5
Acetat	9.6	6.5	10.1	6.8	10.7	11.5	10.0	7.2
Lactat	26.6	18.5	27.0	15.6	22.5	15.1	20.6	12.6
Succinat	0.0	2.6	0.1	2.8	0.4	2.6	1.0	4.4

Bei Clostridien haben Ljungdahl et al. (1965) nachgewiesen, daß unmarkiertes Formiat den Einbau von $^{14}\text{CO}_2$ in die Methylgruppe des Acetats unterdrückt, da das aus $^{14}\text{CO}_2$ entstehende ^{14}C -Formiat durch den unmarkierten Formiatpool verdünnt wird. Da Formiat die Vorstufe der Methylgruppe des Acetats ist, kam es neben einigen doppeltmarkierten Acetatsmolekülen vorwiegend zur Bildung carboxylmarkierter C_2 -Stücke. Die Gegenwart unmarkierten Bicarbonats veränderte das Markierungsverhältnis nicht, es wurde lediglich die Gesamtmarkierungsrate niedriger.

In Analogie dazu wurde *C. biazotea* ATCC 486 im Puffer in Gegenwart von Formiat und Bicarbonat mit 3- ^{14}C und 3,4- ^{14}C -Glucose inkubiert. Das Acetat wurde isoliert und die Markierungsverteilung bestimmt. Tab. 17 zeigt das Ergebnis dieses Versuches.

Tab.17: Bildung markierten Acetats bei der anaeroben Vergärung 3,4- ^{14}C -Glucose in Gegenwart unmarkierter C_1 -Stücke durch *C. biazotea* ATCC 486.

Ansatz: Phosphatpuffer pH 5.5, 0.1 M
Markierte Glucose: 6.5×10^5 Ipm
Gasphase: N_2

Zeit: 5 Stunden
Werte in Prozent des eingesetzten ^{14}C .

Bedingungen	Glucose					
	3- ^{14}C			3,4- ^{14}C		
	KOH i.Reak- tions- gefäß	For- miat 6 μM	Bicar- bonat 36 μM	KOH i.Reak- tions- gefäß	For- miat 6 μM	Bicar- bonat 36 μM
Acetat	23.6	25.7	22.8	19.7	23.3	17.4

Es zeigt sich auch in diesem Versuch, daß die Anwesenheit von C_1 -Stücken zu keiner signifikanten Verringerung der Gesamtmarkierung im Acetat führt, obgleich in diesem Versuch eine 7-fach höhere Menge an unmarkiertem Bicarbonat angeboten wurde, als im vorhergehenden Versuch (Tab. 16).

Wie aus der Markierungsverteilung im Acetat (Tab.18) zu erkennen ist, bewirkt die Anwesenheit unmarkierten Formiats keine Veränderung des Verhältnisses zugunsten der Markierung in der Carboxylgruppe (C-1).

Tab.18: Prozentuale Verteilung der Markierung im Acetat* bei der anaeroben Vergärung 3,4- ^{14}C -Glucose durch *C. biazotea* ATCC 486 in Gegenwart unmarkierter C_1 -Stücke.

Bedingungen	Glucose-					
	3- ^{14}C			3,4- ^{14}C		
	KOH	Formiat	Bicarbonat	KOH	Formiat	Bicarbonat
Acetat						
C-1	52.0	55.3	49.3	42.0	42.6	49.7
C-2	48.0	44.7	50.7	58.0	57.4	50.3

* = Das Acetat stammt aus dem Versuch, dessen Ergebnis in Tabelle 17 aufgeführt ist.

3.5.2.2. Einfluß von markiertem Formiat und Bicarbonat auf die Bildung von Acetat bei Vergärung von unmarkierter Glucose

Nach den Ergebnissen von Lentz und Wood (1955) fixieren die Zellen von *C. thermoaceticum* $^{14}CO_2$ sehr schnell in beide C-Atome des Acetats. Eine genauere Analyse der markierten Produkte durch

Ljungdahl und Wood (1964) ergaben, daß von der Gesamtfixierung in Säuren etwa 80 % im Acetat wiedergefunden wurde. Das genaue prozentuale Verhältnis der Säuren lautete: Acetat : Formiat : Lactat : Succinat : 83,9 : 9,7 : 6,4 : 0.02.

Um nachzuprüfen, ob auch bei den Cellulomonasstämmen nach $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung das Produkt mit der höchsten Markierung Acetat ist, wurden 8 Stämme im Puffer unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart unmarkierter Glucose mit markiertem Bicarbonat inkubiert. Die prozentuale Markierungsverteilung ist in Tab.19 zusammengefaßt.

Tab.19: Verteilung der Markierung auf Säuren nach CO_2 -Fixierung.

Ansatz: Phosphatpuffer 0.1 M, pH 5.5
Markiertes Bicarbonat: 7×10^6 Ipm
Gasphase: N_2

Zeit: 7 Stunden

Werte in Prozent der Gesamtimpulszahl der Säuren.

	Formiat	Acetat	Succinat
C.biazotea ATCC 486	3.5	3.1	93.4
C.cellasea NCIB 8075	1.7	1.9	96.4
C.fimi ATCC 484	0.9	0.6	98.5
C.fimi ATCC 15724	2.7	3.0	94.3
C.flavigena ATCC 482	0.8	0.7	98.5
C.gelida ATCC 488	2.8	3.5	93.7
C.subalbus NCIB 8075	3.6	2.7	93.7
C.uda ATCC 491	5.9	5.7	88.4

Die Werte für die Markierung im Lactat lagen bei den meisten Stämmen unterhalb der Nachweisgrenze, bei den anderen höchstens bei 0.1 % der Gesamtmarkierung der Säuren. Aus diesem Grund sind die Werte für Lactat in der Tabelle nicht angegeben.

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß bei allen Stämmen das Endprodukt mit der höchsten Markierung Succinat ist. Acetat und Formiat sind etwa gleich stark, jedoch bedeutend geringer als Succinat markiert. Dies spricht dafür, daß Acetat aus den Positionen 3 und 4 der Glucose nicht durch Synthese aus 2 C₁-Stücken entsteht: denn während sich bei der CO₂-Fixierung etwa 95 % der Markierung im Succinat und nur etwa 3 % im Acetat befinden, gelangen bei der Verwertung von 3,4-¹⁴C-Glucose nur etwa 0.1 - 1 % der Markierung in Succinat, während sie im Acetat 10 bis 20 mal stärker ist. Dieser Unterschied in der Markierungsverteilung wäre nur dann zu verstehen, wenn man 2 verschiedene Wege für den Stoffwechsel von CO₂ annehmen würde. Es gibt jedoch keinen Grund anzunehmen, daß endogen, aus Glucose entstehendes CO₂ von den Zellen auf einem anderen Weg metabolisiert wird, als CO₂, das von außen in die Zelle gelangt.

Nach den Angaben von Lentz und Wood (1955) wird von *Cl. thermoaceticum* auch aus markiertem Formiat markiertes Acetat gebildet. Dieser Organismus führt rasche Austauschreaktionen zwischen Formiat und CO₂ (ohne H₂-Bildung) einerseits und CO₂ und der Carboxylgruppe von Pyruvat andererseits, durch. Über die Reaktionen: $^{14}\text{CHOOH} + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{CHOOH} + ^{14}\text{CO}_2$ und $^{14}\text{CO}_2 + \text{CH}_3\text{COCO}_2\text{H} \longrightarrow \text{CO}_2 + \text{CH}_3\text{CO}^{14}\text{COOH}$ werden die markierten Ausgangsprodukte für die Bildung doppeltmarkierten Acetats bereitgestellt.

Daher wurden 4 Stämme der Gattung *Cellulomonas* in Gegenwart unmarkierter Glucose und Bicarbonat mit markiertem Formiat inkubiert und auf die Bildung markierten Acetats hin untersucht.

Aus Tab. 2o geht hervor, daß keiner der Stämme aus Formiat Acetat bilden kann. Wie man schon an der relativ kräftigen Markierung im Lactat ersieht, findet ein Austausch zwischen der Carboxylgruppe des Pyruvats und markiertem Formiat statt. Im Gegensatz zu den Clostridien, bei denen sowohl CO_2 , als auch Formiat mit der Carboxylgruppe des Pyruvats austauscht, ist bei den Cellulomonasstämmen nur Formiat am Austausch beteiligt.

Tab.2o: Markierte Endprodukte bei der anaeroben Vergärung von Glucose in Gegenwart von markiertem Formiat durch Stämme der Gattung Cellulomonas.

Ansatz: Phosphatpuffer 0.1 M, pH 5.5

Markiertes Formiat: 10^6 Ipm

Gasphase: N_2

Werte in Prozent des eingesetzten ^{14}C

x = nicht untersucht.

	CO_2	Acetat	Lactat	Succinat
C.biazotea ATCC 486	2.6	0.0	5.8	0.1
C.gelida ATCC 488	x	0.0	9.2*	
C.subalbus NCIB 8o75	x	0.0	11.8*	
C.uda ATCC 491	x	0.0	2.6*	

* = Succinat wurde nicht abgetrennt.

Ein zweiter Unterschied besteht darin, daß bei den Clostridien markiertes Formiat und markiertes CO_2 über Pyruvat einen Einfluß auf die Bildung doppeltmarkierten Acetats ausüben, während bei den Cellulomonasstämmen markierte C_1 -Stücke nicht in Acetat gelangen.

Aus den Ergebnissen der Versuche mit markierten und unmarkierten C_1 -Stücken kann man ableiten, daß diese weder an der Bildung des Acetats beteiligt sind, noch einen Einfluß auf die intramolekulare Verteilung der Markierung besitzen. Man kann daher annehmen, daß bei den Cellulomonasstämmen keine De Novo Synthese des Acetats stattfindet.

3.5.3. Umbau der Zuckerphosphate

Wenn die Bildung doppeltmarkierten Acetats aus 3- ^{14}C - und 3,4- ^{14}C Glucose weder durch Neusynthese eines C_1 -Stückes, noch, wie unter 3.5.1. beschrieben, über einen nicht-glykolytischen Abbauweg erfolgt, dann liegt die Vermutung nahe, daß die markierten C-Atome schon vor der Spaltung in Triosen in die Seitenpositionen der Hexose transferiert wurden, von wo aus sie nach glycolytischem Abbau in das Acetat gelangen. Einen Hinweis, daß dieser Mechanismus ablaufen könnte, lieferte bereits die Beobachtung, daß bei Vergärung von 3,4- ^{14}C -Glucose signifikante Mengen an ^{14}C im α - und β -C-Atom des Lactats auftraten.

Die Frage, ob die Umverteilung der Markierung schon vor der Bildung von Pyruvat erfolgt, kann durch die Vergärung carboxylmarkierten Pyruvats beantwortet werden. Wenn die Verteilung vor der Bildung von Triosen erfolgt, dann sollte aus carboxylmarkiertem Pyruvat kein markiertes Acetat gebildet werden und das aus Pyruvat entstehende Lactat dürfte nur in der Carboxylgruppe Markierung tragen.

C. biazotea ATCC 486 wurde auf Glucose und Pyruvat kultiviert. Die auf den verschiedenen Substraten angezogenen Zellen wurden in getrennten Ansätzen mit carboxylmarkiertem Pyruvat in Gegenwart unmarkierter Glucose anaerob in Puffer inkubiert. Als Kontrollversuch wurde Zellen, die auf Glucose angezogen waren, 3,4- ^{14}C -Glucose angeboten. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tab. 21 aufgeführt. Sie zeigen, daß zwischen Anzucht auf Glucose und der auf Pyruvat kein Unterschied besteht.

Tab. 21: Markierte Endprodukte bei der anaeroben Vergärung von carboxylmarkiertem Pyruvat in Gegenwart unmarkierter Glucose und bei der Vergärung 3,4- ^{14}C -Glucose durch *C. biazotea* ATCC 486.

Ansatz: Phosphatpuffer 0.1 M, pH 5.5
 Markiertes Pyruvat: 5.8×10^5 Ipm
 Markierte Glucose: 8.2×10^5 Ipm
 Gasphase: N_2

Zeit: 4 Stunden

Werte in Prozent des eingesetzten ^{14}C

Anzucht in:	Glucose	Glucose	Pyruvat
Gärsubstrat:	3,4- ^{14}C -Glucose	1- ^{14}C -Pyruvat	1- ^{14}C -Pyruvat
markierte Produkte:			
CO_2	4.8	20.1	9.2
Formiat	14.6	17.9	3.5
Äthanol	4.6	0.0	0.0
Acetat	12.0	0.0	0.0
Lactat	36.2	46.0	70.3
Succinat	0.9	0.2	0.1

Aus 1- ^{14}C -Pyruvat wird kein markiertes Acetat gebildet, obgleich natürlich Acetat entsteht, was am Auftreten markierter C_1 -Stücke erkennbar ist. Aus 3,4- ^{14}C -Glucose dagegen entstehen, wie zu erwarten, markierte C_2 -Stücke. Auch die Verteilung der Markierung im Lactat, stimmt mit diesem Befund überein (Tab. 22).

Tab.22: Prozentuale Verteilung der Markierung im Lactat* bei Vergärung von 1-¹⁴C-Pyruvat und 3,4-¹⁴C-Glucose durch C.biazotea ATCC 486.

Anzucht in:	Glucose	Glucose	Pyruvat
Gärsubstrat:	3,4- ¹⁴ C-Glucose	1- ¹⁴ C-Pyruvat	1- ¹⁴ C-Pyruvat
Lactat			
C-1	79.3	99.6	99.0
C-2	9.2		
C-3	11.5	0.4**	1.0**

* = Das Lactat stammt aus dem Versuch, dessen Ergebnis in Tab. 21 aufgeführt ist.

** = Die Verteilung der Markierung zwischen den C-Atomen 2 und 3 wurde nicht untersucht.

Aus der Tab. 22 geht hervor, daß Lactat, das aus 3,4-¹⁴C-Glucose gebildet wird, in allen drei C-Atomen Markierung trägt. Da Pyruvat die gleiche Markierungsverteilung aufweisen muß, wie Lactat, entstehen bei der Spaltung von Pyruvat markierte C₁ und C₂-Stücke, was ja auch zutrifft (Tab.21). Dagegen befindet sich im Lactat, das aus carboxylmarkiertem Pyruvat entstanden ist, fast 100 % der Markierung im C-Atom 1, und vernachlässigbar wenig Markierung in den C-Atomen 2 und 3. Da aber gerade diese C-Atome den beiden C-Atomen des Acetats bzw. Äthanolis entsprechen, ist das Fehlen von Aktivität in C₂-Stücken verständlich. (s.Tab.21)

Da man annehmen muß, daß Pyruvat in allen drei Versuchen das gleiche Schicksal erleidet, zeigt der Versuch, daß markiertes Acetat aus 3,4-¹⁴C-Glucose nur dadurch entstehen kann, daß vor

dem Abbau zu Pyruvat eine Umverteilung der C-Atome erfolgt.

3.5.3.1. Bestimmung der Markierungsverteilung in der Glucose und in Gärprodukten

Um die Umverteilung der C-Atome in der Glucose direkt zu zeigen, wurde nach Kurzzeitfütterung (5, bzw. 10 min) von 1-¹⁴C-, 2-¹⁴C- und 3-¹⁴C-Glucose hoher spezifischer Aktivität an *C. biazotea* ATCC 486, Glucose-P papierchromatographisch aus dem Zellextrakt isoliert, dephosphoryliert und mit Hilfe von *Leuconostoc mesenteroides* in CO₂, Äthanol und Lactat zerlegt. Dabei stammt CO₂ aus der Position 1, Äthanol aus den Positionen 2 und 3, und Lactat aus den Positionen 4, 5 und 6 der Glucose. Lactat, und das nach Oxydation von Äthanol entstandene Acetat, wurden chemisch weiter zerlegt und die Markierung der einzelnen C-Atome bestimmt. Sie wurde in Tab. 23a in Prozent der Gesamtaktivität der Glucose ausgedrückt. Die Verteilung im Äthanol aus 1-¹⁴C-Glucose wurde nicht weiter untersucht, da dessen Markierung zu gering war.

Aus Tab. 23a geht hervor, daß der Austausch der Markierung von C-1 nach C-6, von C-2 nach C-5 und von C-3 nach C-4 bevorzugt erfolgt. Dieser Austausch ist verständlich, wenn man einen Austausch über die reversiblen Aldolase- und Triosephosphatisomerasereaktionen in Betracht zieht. Darüber hinaus findet jedoch eine weitere Umverteilung, und zwar vor allem von C-2 nach C-3 und von C-3 nach C-2 statt.

Eine Zeitabhängigkeit ergab sich nur bei dem Versuch mit 1-¹⁴C-Glucose, während sie bei den Versuchen mit 2-¹⁴C- und 3-¹⁴C-Glucose, die mit einer anderen Charge von Bakterien ausgeführt wurden, nicht auftrat.

Wir haben in diesem Versuch Alanin aus dem 5 min-Versuch zum Abbau herangezogen. Da dieses im Falle der 3-¹⁴C-Glucose zu wenig Markierung trug, wurde es hier zusammen mit dem des 10 min-Versuches abgebaut. In Tab. 23b sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Tab.23a: Prozentuale Verteilung der Markierung in Glucose-P nach Verfütterung positionsmarkierter Glucose bei C.biazotea ATCC 486.

Ansatz: Phosphatpuffer 0.01 M, pH 6.5

Gasphase : N₂

	Vergorene Glucose				
	1- ¹⁴ C		2- ¹⁴ C		3- ¹⁴ C
Eingesetzte Glucose (Ipm) je	4.3 × 10 ⁶		6.6 × 10 ⁶		4.6 × 10 ⁶
Glucose-P (Ipm)	4.5 × 10 ⁵	10 ⁵	1.3 × 10 ⁵	8.3 × 10 ⁴	7 × 10 ⁴
Versuchszeit (min)	5	10	5	10	5
Glucose-P					
C-1	83.4	69.5	3.7	3.2	2.6
C-2	1.7	2.3	44.5	43.9	11.6
C-3			6.0	10.2	52.4
C-4	1.4	2.1	5.8	6.2	25.6
C-5	0.5	0.3	38.2	36.5	4.5
C-6	13.0	25.8	1.8	0.0	3.3

Dabei wurden neben den experimentell gewonnenen, auch die theoretisch zu erwartenden Daten aufgeführt. Da an der Bildung des Alanins sowohl die C-Atome 1 bis 3, als auch 4 bis 6 der Glucose beteiligt sind, muß man die Summe der Markierung der in der Glycolyse homologen C-Atome (1+6, 2+5, 3+4) zum Vergleich heranziehen. Es zeigt sich dann, daß die Verteilung der Markierung in Alanin und Glucose in großen Zügen übereinstimmt. Auch die Relation der Markierung der C-Atome untereinander ist bei den empirisch gefundenen Werten und den theoretischen Werten etwa gleich groß.

Tab.23b: Theoretische und experimentell gefundene prozentuale Markierungsverteilung im Alanin nach Vergärung positionsmarkierter Glucose durch *C.biazotea* ATCC 486.

Anteil des Alanin an eingesetztem ^{14}C (%)	Vergorene Glucose-					
	$1-^{14}\text{C}$		$2-^{14}\text{C}$		$3-^{14}\text{C}$	
	7.9		0.9		0.8	
Markierungs- verteilung	Theor.	Exper.	Theor.	Exper.	Theor.	Exper.
C-1	} 3.6	} 5.6	11.8	5.9	75.5	88.7
C-2			82.7	94.1	17.7	8.0
C-3			5.5	0.0	6.8	3.3

Eine vollständige Übereinstimmung der theoretischen und tatsächlich erhaltenen Werte kann man jedoch nicht erwarten, denn während die theoretischen Werte aus der ausschließlich am Ende des Versuchs vorliegenden Verteilung der Markierung in der Glucose errechnet werden, handelt es sich bei den Werten, die man durch Abbau der Endprodukte erhält, um einen Mischwert aller, zwischen den ersten und letzten Produkten entstandenen Werte. Ein Produkt, das früh entsteht, trägt eine asymmetrischere Markierungsverteilung, die etwa der der eingesetzten Glucose entspricht, als ein Produkt, das zu einem späteren Zeitpunkt aus Glucose entsteht, die bereits einer stärkeren Umverteilung unterworfen war. Da der Abbau eines Endproduktes sowohl die früh, als auch die später gebildeten Produkte trifft, erhält man einen Durchschnittswert aller gebildeter Verteilungen.

Bei Alanin kommt noch dazu, daß seine Bildung nur bei Anwesenheit von Stickstoff ablaufen kann. Da unsere Versuche in Stickstoff-freiem Puffer ausgeführt wurden, kann die Bildung von Alanin nur am Anfang der Glucoseverwertung stattfinden, solange die Zellen noch Stickstoff aus ihrem eigenen Pool bereitstellen können.

Aus diesem Grund wird die Markierung in den C-Atomen des Alanins ähnlich verteilt sein, wie die in den homologen C-Atomen der Glucose bei Versuchsanfang, also relativ asymmetrisch, was in Tab. 23b auch zu erkennen ist.

Da der Ausgangspunkt der Untersuchung über die Umverteilung der C-Atome die Bildung von doppeltmarkiertem Acetat und Äthanol aus den Positionen 3 und 4 der Glucose war, wurde noch eine ausführliche Analyse der Markierungsverteilung im Glucose-P und Endprodukten nach Fütterung mit 3-¹⁴C- und 3,4-¹⁴C-Glucose an *C. biazotea* ATCC 486 durchgeführt. Die Zellen wurden 10 min mit markierter Glucose anaerob inkubiert. In Tab. 24a ist die prozentuale Verteilung der Markierung auf einige Produkte wiedergegeben.

Die geringe Markierung im Äthanol beruht vermutlich darauf, daß es durch den N₂-Strom, der während der gesamten Versuchszeit das Inkubationsgemisch durchströmte, ausgetrieben wurde.

Glucose-P wurde dephosphoryliert und wie beschrieben abgebaut. Die Verteilung der Markierung in der isolierten Glucose zeigt Tab. 24 b.

Die Werte für 3-¹⁴C-Glucose ähneln denen des vorherigen Versuchs (Tab. 23a). Auch bei diesem Versuch besteht in der Höhe der Markierung folgende Reihenfolge : C-3 > C-4 > C-2 > C-5 > C-1 > C-6. Lediglich der symetrische Austausch in die unteren 3 C-Atome erreicht nicht die Höhe wie im letzten Versuch.

Tab.24a: Prozentuale Markierungsverteilung auf Endprodukte nach anaerober Vergärung positionsmarkierter Glucosen durch *C.biazotea* ATCC 486.

Ansatz: Phosphatpuffer: 0.01 M, pH 6.5

Markierte Glucosen: 10^7 Ipm

Gasphase: N_2

Zeit: 10 min

Werte in Prozent des eingesetzten ^{14}C

	vergorene Glucose-	
	3- ^{14}C	3,4- ^{14}C
<u>Produkte im Überstand</u>		
Formiat	0.9	2.1
Acetat	5.6	4.6
Äthanol	0.2	0.1
Lactat	40.0	40.1
Succinat	0.5	0.3
nicht verbrauchte Glucose	3.2	2.3
<u>Extrahierte Produkte</u>		
Glucose-P	8.6	6.1
Fructose-P	6.6	4.2
Alanin	2.3	3.7
Lactat	10.0	14.7

Tab.24b: Prozentuale Verteilung der Markierung in Glucose-P nach Verfütterung positionsmarkierter Glucose bei *C.biazotea* ATCC 486.

	vergorene Glucose-	
	3- ^{14}C	3,4- ^{14}C
Glucose-P		
C-1	8.0	7.7
C-2	12.4	11.2
C-3	56.3	33.5
C-4	17.4	42.9
C-5	4.1	3.0
C-6	1.8	1.7

Auch aus den Ergebnissen der 3,4-¹⁴C-Glucose erkennt man, daß eine Verteilung der C-Atome nicht gleichmäßig erfolgt. Die oberen 3 C-Atome der Glucose unterliegen einer stärkeren Umverteilung als die unteren 3 C-Atome. Bei ursprünglich gleich hoher Markierung in C-3 und C-4 ist nach Versuchs-ende C-3 schwächer markiert als C-4.

Die Werte für die prozentuale Verteilung der Markierung in Acetat, Lactat und Alanin sind in Tab. 24c aufgeführt.

Auch in diesem Versuch stimmen die theoretisch zu erwartenden und die tatsächlich gefundenen Werte für Lactat und Alanin nicht völlig überein. Wie im letzten Versuch mit 3-¹⁴C-Glucose, liegen auch in diesem Versuch mit 3-¹⁴C- und 3,4-¹⁴C-Glucose die Werte für die Carboxylgruppen zu hoch und die in den α- und β-C-Atomen zu niedrig. Die mögliche Ursache für die Abweichung von den theoretischen Werten wurde schon erwähnt.

Die theoretischen Werte für Acetat stimmen dagegen mit den experimentell gefundenen Werten bei 3-¹⁴C-Glucose gut überein, während sie bei 3,4-¹⁴C-Glucose etwas größere Abweichungen aufweisen. Eventuell ist ein späterer Entstehungszeitpunkt des Acetats, an dem die Verteilung der Markierung innerhalb der Glucose schon fortgeschritten war, dafür verantwortlich, daß die Werte für Acetat, im Gegensatz zu denen von Lactat und Alanin, besser mit den theoretischen Werten übereinstimmen.

Die Ergebnisse lassen auch erkennen, daß Alanin und Lactat aus den gleichen C-Atomen der Glucose über Pyruvat gebildet werden, und daß doppeltmarkiertes Acetat durch Decarboxylierung von Pyruvat entsteht. C-1 des Acetats, das C-2 des Lactats und Alanins, bzw. C-2 und C-5 der Glucose entspricht, ist bei dem Versuch mit 3-¹⁴C-Glucose stärker markiert, als C-2, das C-3 des Lactats und Alanins, bzw. C-1 und C-6 der Glucose entspricht.

Tab.24c: Theoretische und experimentell gefundene, prozentuale Markierungsverteilung in Endprodukten nach Vergärung positionsmarkierter Glucose durch *C.biazotea* ATCC 486.

Markierungs- verteilung	Vergorene Glucose			
	$3-^{14}\text{C}$		$3,4-^{14}\text{C}$	
	Theor.	Exper.	Theor.	Exper.
Extrahierte Produkte				
Alanin				
C-1	73.7	92.5	76.4	94.6
C-2	16.5	5.9	14.2	2.9
C-3	9.8	1.6	9.4	2.5
Lactat				
C-1	73.7	92.2	76.4	94.7
C-2	16.5	4.6	14.2	2.8
C-3	9.8	3.2	9.4	2.5
Produkte aus dem Überstand				
Lactat				
C-1	73.7	90.4	76.4	93.8
C-2	16.5	5.8	14.2	3.4
C-3	9.8	3.8	9.4	2.8
Acetat				
C-1	62.8	61.3	60.2	55.4
C-2	37.2	38.7	39.8	44.6

Acetat, das bei Vergärung von C-3,4-¹⁴C-Glucose entsteht, ist in beiden C-Atomen etwa gleich stark markiert. Auch diese Verteilung kann man in C-2 und C-3 des Lactats und Alanins wiederfinden und stimmt mit früheren Abbauten gut überein.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß die Bildung doppeltmarkierten Acetats über keinen anderen Weg als über die Glycolyse stattfindet. Die Höhe der Markierung in den Produkten und die unterschiedliche Markierungsverteilung innerhalb der Produkte hängt von der Intensität der Reaktionen ab, die die Umstellung der C-Atome in der Glucose bewirken.

Der Mechanismus, der zu diesen Umstellungen von C-Atomen führt, wird im anschließenden Abschnitt diskutiert.

3.5.3.2. Mechanismen der Kohlenstoffverschiebungen in Hexosen

Enzymatische Spaltungen des Kohlenstoffskeletts von Hexosen finden nur zwischen den C-Atomen C-1 und C-2, bzw. C-2 und C-3 oder C-3 und C-4 statt. So bewirkt die 6-P-Gluconat Dehydrogenase eine Spaltung von 6-P-Gluconat in CO₂ und Ribulose-5-P zwischen den C-Atomen C-1 und C-2. Die Fructose-6-P-Phosphoketolase und die Transketolase katalysieren eine Trennung des Hexosemoleküls zwischen C-2 und C-3, während die Aldolase und die Transaldolase eine Trennung zwischen den C-Atomen C-3 und C-4 ermöglichen.

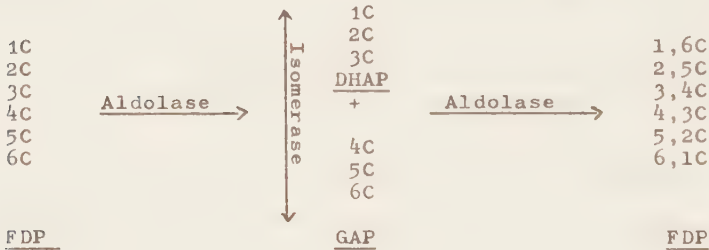
Da in den Zellen jedoch nicht nur Zucker abgebaut wird, sondern auch assimilatorische Vorgänge ablaufen, die zur Bildung verschiedener Zucker und zur Synthese von Polysacchariden führen, laufen die meisten dieser Reaktionen auch in erheblichem Umfang in umgekehrter Richtung ab. Die Fructose-1,6-di-P-Aldolase bewirkt die Verknüpfung von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehydphosphat (GAP) zu Fructose-6-P (FDP). Die Rück-

reaktion der Fructose-6-P-Phosphoketolase ist nicht beschrieben. Eine Reversion der Decarboxylierung von Hexosen kommt nur in Sonderfällen vor, wie z.B. bei einigen methanverwertenden Organismen (Kemp und Quayle, 1967).

1. Die symmetrische Umverteilung der C-Atome

Die Umkehr der hochaktiven Trioseisomerase und der Aldolase führt zur Bildung von Hexosen mit symmetrischen Isotopenverteilungen entsprechend (I):

(I)



Aus den nur spärlich vorliegenden Beispielen für symmetrische Umverteilungen von Kohlenstoffatomen in Hexosen, seien die Fütterungsversuche von markierten Glucosen an Chlorella (Kandler und Gibbs, 1959) und an Weizenblättern (Altermatt und Neish, 1956) genannt. Bei beiden Versuchen wurde ein symmetrischer Austausch von rund 15 % gefunden.

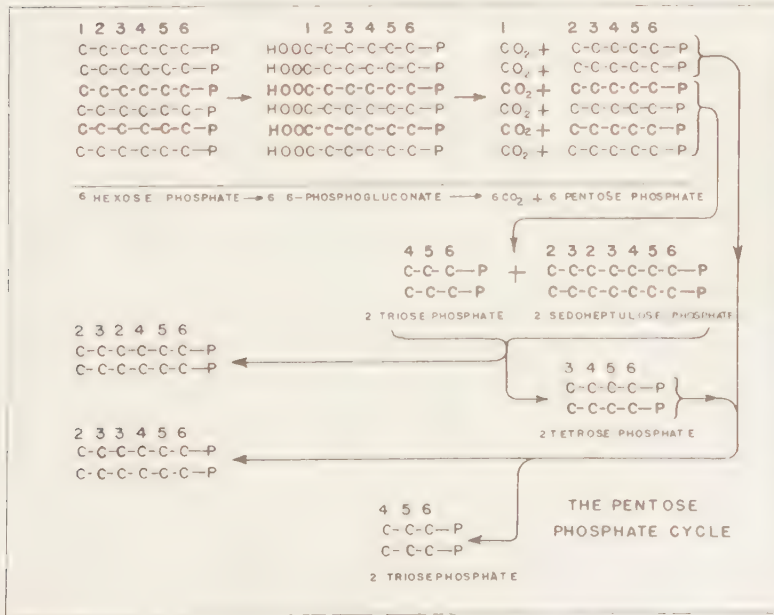
2. Die asymmetrische Umverteilung der C-Atome

Die Reaktionen der Transaldolase und Transketolase führen zu einer Verschiebung der oberen drei Kohlenstoffatome der Hexosen. Die Positionen 4, 5 und 6 bleiben davon unberührt. Das hängt mit der Wirkungsweise der Transaldolase zusammen, die Dihydroxyaceton (DHA) auf GAP überträgt. Aus diesem Grund können zwar C-Atome von den Positionen 1, 2 und 3 an die Positionen 4, 5 und 6

einer neusynthetisierten Hexose transferiert werden, aber ein Transfer von unten nach oben ist über diesen Mechanismus nicht möglich. Wird z.B. durch die Transaldolase 3-¹⁴C-DHA auf 3-¹⁴C-GAP übertragen, das durch Aldolase- und Isomerase-reaktion aus 1-¹⁴C-Glucose entstanden ist, so entsteht 1,6-¹⁴C-FDP. Ist das Ausgangssubstrat dagegen 6-¹⁴C-Glucose, so entsteht nach der Spaltung zwar auch 3-¹⁴C-GAP, das über die Transaldolase aber immer nur mit einem unmarkierten DHA zu 6-¹⁴C-Fructose verknüpft wird. Erst wenn gleichzeitig die unter 1. beschriebenen Reaktionen ablaufen, kommt es zur Bildung von 1,6-¹⁴C-FDP. Die Beteiligung der Aldolase-Isomerasereaktionen läßt sich daher am leichtesten durch den Einsatz 6-¹⁴C-Glucose zeigen, da ausschließlich über diesen Mechanismus Markierung in die oberen Positionen gelangen kann.

In der Zelle spielen sich die umgruppierenden Reaktionen vor allem im Regenerationscyclus des HMP-Weges ab. Abb. 5

Abb.5: Verlauf der Hauptreaktionen im Pentosephosphatcyclus. Die Zahlen beziehen sich auf die Position der Kohlenstoffatome im eingesetzten Hexose-P. Nach Beevers (1956)



zeigt die Umwandlung von 6 Hexosen nach Decarboxylierung in 4 Hexosen und 2 Triosen. Nach Abspaltung des C-Atoms 1 als CO_2 wird durch die Umwandlungen Position 2 zu Position 1 der neu gebildeten Hexose. Durch Transketolase- und Transaldolasereaktionen entstehen 2 Moleküle Hexose mit der Reihenfolge der C-Atome 2-3-2-4-5-6. Durch eine weitere Transketolasereaktion, bei der die C-Atome 2 und 3 einer Pentose auf die bei der vorigen Reaktion entstandene Erythrose-4-P übertragen werden, entsteht eine Variation dieser Reihenfolge nach 2-3-3-4-5-6. Im nächsten Cyclus würde C-2, im dritten Cyclus C-3 der eingesetzten Glucose als CO_2 freigesetzt werden. Die beiden Triosen mit den Positionen 4-5-6 können entweder zu Hexose resynthetisiert oder abgebaut werden.

Transketolase und Transaldolase können aber auch direkt an Hexosen wirksam werden. Abb. 6 zeigt die Möglichkeiten

Abb. 6:

Umverteilung von C-Atomen in Fructose-6-P durch das Zusammenwirken von Transketolase (TK), Transaldolase (TA), Ribulose Isomerase (IS) und Xylulose Epimerase (EP).

Aus: Wood und Katz (1958).

Aus: Wood und Katz (1958)



der Umverteilung von C-Atomen durch diese Enzyme in Verbindung mit Pentose Isomerase- und Epimerasereaktionen. Aus 2 Molekülen Fructose-6-P und einem Molekül Triose entstehen 3 Moleküle Pentosen (X, Y, Z). Durch reversible Reaktionen werden 2 Moleküle Fructose resynthetisiert. Rekombiniert man die entstehenden Pentosen zu Hexosen, so gelangt man zu 5, von der Ausgangsverbindung verschieden aufgebauten Fructose-6-P, deren C-Atome 1, 2 und 3 in der Tab. 25 aufgeführten Art (1-5) variieren können. Die Positionen 1 und 2 können nach Position 3 und Position 3 kann nach Position 2 und 1 transferiert werden. Die Positionen 4, 5 und 6 bleiben von der Umwandlung unberührt. Diese 5 Typen treten zu denen, die im HMP-Regenerationscyclus nach Decarboxylierung gebildet worden waren, hinzu.

Tab.25: Typen von Fructose-P, die durch die umgruppierende Wirkung der in Abb. 6 beteiligten Enzyme gebildet wurden.

Position im eingesetzten Fructose-6-P	Verteilung von Kohlenstoffatomen in der oberen Hälfte der gebildeten Fructose-6-P				
	1	2	3	4	5
1	C-1	C-3	C-3	C-1	C-3
2	C-2	C-3	C-3	C-2	C-3
3	C-1	C-2	C-1	C-2	C-3

Da sowohl die Decarboxylierung als auch die direkte Umgruppierung an bereits früher umgruppierten Hexosen angreifen können, ist die Bildung weiterer Fructose-6-P-Typen möglich. So kann, wie in Abb. 7 gezeigt wird, in der von einer bereits umgruppierten Fructose (Typ 1 aus Tab.25) ausgegangen wird, Aktivität von C-2 nach C-1 gelangen.

Asymmetrische Umgruppierungen in der Hexose sind in der Literatur nur in wenigen Beispielen beschrieben worden :

1958 wurde von Wood et al. der Einbau von 2,6- ^{14}C -Glucose in Lactose bei Kühen untersucht. Der Abbau der Galaktose ergab, daß die Markierung über alle 6 C-Atome verteilt war. Die Reihenfolge der Markierungsstärke in den C-Atomen war : $2 > 6 > 5 > 3 > 1 > 4$. Durch eine Parallelprobe mit 6- ^{14}C -Glucose konnte gezeigt werden, daß nicht von C-6, sondern nur von C-2 aus eine Umverteilung der Kohlenstoffatome stattgefunden hatte. Als ein weiteres Beispiel kann man die Fütterung von markierter Glucose an *Chlorella pyrenoidosa* (Kandler und Gibbs, 1959) anführen. Die Verteilung der Markierung im Glucose-P zeigte, daß an der Umverteilung der C-Atome zwar dominierend ein symmetrischer Austausch, jedoch auch deutlich eine asymmetrische Komponente beteiligt war. Auch die Verteilung der Markierung in der Shikimisäure von *E.coli* nach Fütterung von positionsmarkierten Glucosen (Srinivasan et al. 1956) kann nicht nur durch symmetrischen Austausch der Kohlenstoffatome in der Glucose erklärt werden.

Betrachtet man die Umverteilung in der Hexose, wie sie aus Abbauten des Glucose-P von *C.biazotea* (Tab.23a, 24b) hervorgeht, so kann man sie tatsächlich aus den, in den 3 vorhergehenden Abschnitten besprochenen Mechanismen verstehen.

Dominierend ist ein symmetrischer Austausch durch die Aldolase-Isomerase Reaktion.

Den asymmetrischen Austausch durch die reversiblen Transaldolase und Transketolasereaktionen kann man aus der Markierungsverteilung in den Positionen 1, 2 und 3 ableiten. Da diese Reaktionen zwar C-3, nicht jedoch C-4 betreffen, wird bei Einsatz von 3,4- ^{14}C -Glucose Position 3 stärker verdünnt, als Position 4. Daraus ist auch die schwächere Markierung im CO_2 und Formiat aus Position 3 gegenüber der aus Position 4

zu erklären. Aus dem gleichen Grund ergibt sich bei Vergärung von 3- ^{14}C und 3,4- ^{14}C -Glucose für Acetat und Äthanol von C-3 her eine stärkere Markierung als von C-4 her.

Wie aus Tab. 25 hervorgeht, würde von C-2 aus, Markierung ausschließlich nach C-3, nicht aber nach C-1 gelangen. Außerdem würde von C-3 aus die Markierung gleichmäßig auf die Positionen 2 und 1 verteilt werden. Dieser vorhergesagten Verteilung widersprechen unsere Ergebnisse: Von C-2 aus gelangt Markierung auch nach C-1, wenn auch in geringerem Ausmaß als nach C-3. Von C-3 aus ist bei unseren Versuchen C-2 stärker markiert als C-1.

Dies kann nur durch die Beteiligung decarboxylierender Reaktionen erklärt werden. Wie aus Abb. 5 zu erkennen ist, wird durch den einmaligen Umlauf des Regenerationscyclus nach Decarboxylierung C-Atom 2 zu C-Atom 1 der neuen Hexose. C-Atom 3 gelangt dabei an Position 2, nicht aber an Position 1, was sich bei einer Gesamtbetrachtung aller aus 3- ^{14}C -Glucose resynthetisierter Hexosen in einer Benachteiligung der Markierung in Position 1 gegenüber der in Position 2 auswirkt.

Eine Decarboxylierung von Hexosen über den HMP-Weg findet bei den Cellulomonasstämmen sowohl unter aeroben, wie unter anaeroben Bedingungen statt. Der Anteil am Gesamtabbau der Glucose ist zwar nicht sehr groß, aber signifikant (Tab. 7, 9, 10.2). Der HMP-Weg kann daher für eine zusätzliche, randomisierende Wirkung verantwortlich gemacht werden.

Für den starken Umbau der Kohlenstoffatome in den Hexosen vor Einschleusung in die Glycolyse sind bei den Stämmen der Gattung Cellulomonas also drei Mechanismen verantwortlich: 1. Die symmetrische Verteilung mit Hilfe der Aldolase- und Isomerasereaktionen. 2. Die asymmetrische Verteilung mit

Hilfe der reversiblen Transaldolase- und Transketolase-reaktionen. Diese beiden Mechanismen sind am stärksten am Umbau beteiligt. 3. Eine Verstärkung der asymmetrischen Verteilung durch den HMP-Weg.

IV. Schlußbetrachtung

Vergleicht man die Ergebnisse der zur Artabgrenzung angewendeten, physiologischen Eigenschaften mit denen, die in Bergey's Manual 7. Auflage verzeichnet sind, so treten in manchen Punkten Differenzen auf:

Von Clark (1951) wird die unterschiedliche Fähigkeit, Xylose und Arabinose zu verwerten, zur Unterscheidung von *C.biazotea* und *C.cellasea* einerseits und *C.fimi* andererseits herangezogen. Aus unseren Versuchen ging jedoch hervor, daß alle Stämme der Gattung *Cellulomonas* diese Pentosen unter Säurebildung verwerten, was auch mit den Ergebnissen von Yamada und Komagata (1972 b) übereinstimmt. Eine andere Abweichung besteht in der NH_4 -Bildung aus Pepton bei *C.biazotea*. Bei Clark bildet diese Art kein Ammoniak, bei uns war sie jedoch eindeutig

positiv. *C.cellasea*, das nach Clark beweglich sein sollte, war in unseren Versuchen stets unbeweglich. Eine weitere Abweichung betraf die Nitratreduktion, die bei *C.gelida* entgegen den Angaben von Clark bei uns positiv war.

Nach den von uns gefundenen Merkmalen erscheinen manche Arten daher identisch. Unterscheidungen lassen sich dann oft nur auf Grund von Morphologie und Pigment treffen. So sind *C.biazotea*, *C.fimi*, *C.gelida*, *C.flavigena* DS/Vaughn und *C.subalbus* beweglich, bilden Nitrit aus Nitrat und NH_4 aus Pepton. Während jedoch *C.biazotea* ein deutlich gelb gefärbtes Pigment bildet und dadurch von den anderen Arten unterscheidbar ist, kann eine Trennung der anderen 4 Arten auf Grund der Pigmentfarbe nicht getroffen werden, da alle weißlich gefärbt sind. Eine Trennung könnte in diesem Fall nur durch morphologische Unterschiede getroffen werden, die, wie aus den Photographien (Abb.1) ersichtlich, jedoch auch nicht immer deutlich sind. In einer zweiten Gruppe würden die Stämme zusammengefaßt sein, die unbeweglich sind, Nitrat reduzieren und kein Ammoniak aus Pepton bilden. In ihr sind *C.cellasea*, *C.flavigena* ATCC 482 und *C.biazotea*, Lechevalier, vertreten. Diese Stämme ließen sich nicht deutlich als Arten trennen, da sie die gleiche Pigmentfarbe und ähnliche Morphologie besitzen. In eine dritte Gruppe gehören *C.cartalyticum*, *C.uda* und der unbenannte Stamm *C.species*, die alle unbeweglich sind, Nitrit aus Nitrat und Ammoniak aus Pepton bilden. *C.species* und *C.uda* lassen sich auf Grund der Morphologie zwar deutlich von *C.cartalyticum*, nicht jedoch voneinander unterscheiden.

Auf Grund der hier beschriebenen Merkmale könnte man weder *C.gelida* von *C.subalbus* und von *C.flavigena* DS/Vaugh, noch *C.cellasea* von *C.flavigena*, noch *C.uda* von *C.species* eindeutig trennen und als eigene Art ansprechen. Die Art-

unterscheidung auf Grund der Pigmentfarbe allein kann unserer Meinung nicht ausreichend sein. Auch die Morphologie ist kein sicheres Differenzierungsmerkmal, da sie bei den Cellulomonasstämmen im Laufe des Wachstums Veränderungen unterworfen ist.

Wir haben daher den Versuch gemacht, neben den klassischen Differenzierungsmerkmalen auch neuere, biochemische Merkmale für eine eindeutige Trennung der Arten zu benützen. Dazu wurden der Zellwandtyp, die Polysaccharidzusammensetzung der Zellwand und die Fähigkeit zur Verwertung einiger Substrate herangezogen.

Auf Grund der Zellwanduntersuchungen kann man die Cellulomonasstämmen in drei größere Gruppen einteilen, innerhalb der man durch die Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen zur Abtrennung von Arten gelangt :

1. Position 3 der Peptiduntereinheit des Mureins ist mit Lysin besetzt. Die Interpeptidbrücke wird von Serin und Asparaginsäure gebildet.

Von allen untersuchten Cellulomonasstämmen besitzt ausschließlich C.cartalyticum diesen Zellwandtyp. An Zellwandzuckern sind Rhamnose, Fucose und Galaktose vertreten. Zusätzlich zu den von allen Stämmen verwerteten Substraten werden von diesem Stamm noch Ribose, Gluconat und L-Lactat angegriffen.

2. Position 3 der Peptiduntereinheit wird von Ornithin besetzt. Asparaginsäure bildet die Interpeptidbrücke. Dieser Typ wird von C.flavigena ATCC 482 und C.biazotea, Lechevalier, vertreten. Beide Stämme stimmen in allen physiologischen Merkmalen völlig überein. Durch den Besitz von Ribose im komplex aufgebauten Polysaccharid der Zellwand unterscheiden sie sich zusätzlich von allen anderen Stämmen. Beide Stämme verwerten Gluconat. Ledig-

lich der Besitz der 6-Desoxy-Talose bei *C.biazotea*, Lechevalier, unterscheidet diese beiden Stämme. Auch schon von Fiedler und Kandler (1972) wurden diese beiden Stämme als identisch und zwar als *C.flavigena* beschrieben.

3. Position 3 der Peptiduntereinheit ist mit Ornithin besetzt, als Interpeptidbrücke dient Glutaminsäure. Diese Gruppe, in der 9 der 12 untersuchten Stämme zusammengefaßt sind, läßt sich durch die Polysaccharid-zusammensetzung der Zellwand in 2 Gruppen unterteilen :

- a) *C.biazotea*, *C.cellasea* und die beiden Stämme von *C.fimi* besitzen ein komplex aufgebautes Polysaccharid. Außer dem gemeinsamen Besitz von Rhamnose ist es jedoch bei diesen 3 Arten verschieden. Während *C.biazotea* zusätzlich Mannose, 6-Desoxy-Talose Glucosamin und Galaktose besitzt, fehlen *C.cellasea* Glucosamin und Galaktose und *C.fimi* 6-Desoxy-Talose Glucosamin und Galaktose. *C.fimi* besitzt dagegen aber noch Glucose und Fucose. Alle Stämme sind in der Lage L-Lactat zu verwerten. *C.biazotea* unterscheidet sich zusätzlich von den anderen beiden Arten noch durch die Fähigkeit, Raffinose zu verwerten. Durch diese Merkmale lassen sich die drei Arten eindeutig voneinander abgrenzen.
- b) Alle Vertreter dieser Gruppe, *C.flavigena* DS/Vaughn, *C.gelida*, *C.subalbus*, *C.uda* und *C.species* besitzen ein einfach aufgebautes Polysaccharid. Neben Glucose und Glucosamin werden keine weiteren Zucker mehr gefunden. Im Gegensatz zur Gruppe a) ist kein Stamm in der Lage, L-Lactat zu verwerten.

Die Trennung von *C.gelida* und *C.subalbus* ist problematisch, da sich diese beiden Stämme in allen Merkmalen gleichen.

Allein in der Morphologie sind Unterschiede festzustellen. Während es sich bei *C.gelida* um relativ kurze, kompakte Stäbchen handelt, wirken die von *C.subalbus* gräziler und etwas länger (Abb. 1).

Bei dem von Vaughn beschriebenen Stamm handelt es sich eindeutig nicht um *C.flavigena*. In allen Merkmalen gleicht er *C.gelida* und *C.subalbus*. Morphologisch ähñelt er mehr *C.subalbus* als *C.gelida*.

Wir schlagen auf Grund der Identität dieser 3 Stämme vor, *C.flavigena* DS/Vaugh und *C.subalbus* zu *C.gelida* zu stellen. Diese Art besitzt, da sie am frühesten beschrieben wurde, (Kellermann et al. 1913) die Priorität.

Eine äñnlich auffällige Übereinstimmung in allen Merkmalen besteht zwischen den Stämmen von *C.uda* und *C.species* ATCC 21399. Auch hinsichtlich der Morphologie und der Bildung schleimig zerfließender, weißer Kolonien auf HD-Agar gleichen sich diese Stämme. Wir können daher dem von Fiedler und Kandler (1972) gemachten Vorschlag, *C.species* ATCC 21399 zu *C.uda* zu stellen, beipflichten.

Die in der Gattung *Cellulomonas* zusammengefaßten Arten erweisen sich nach physiologischen und biochemischen Eigenschaften sowie hinsichtlich des Zellwandaufbaues als relativ einheitlich. Das gilt auch für die von Davis und Newton (1969) in zwei getrennte Gruppen coryneformer Organismen gestellten Stämme von *C.biazotea* und *C.flavigena*. Nimmt man den Zellwandtyp als Differenzierungsmerkmal, dann erscheint diese starke Trennung nicht gerechtfertigt.

Diese Organismen, die von Davis und Newton zusammen mit *C.biazotea* in eine Gruppe gestellt wurden, unterscheiden sich von diesen sowohl in der Art der Quervernetzung, als auch in der Aminosäuresequenz der Interpeptidbrücke. Auch *Brevibacterium ammoniagenes*, das zu *C.flavigena* gestellt

wurde, besitzt mit dem L-Lys-L-Ser-L-Thr-L-Ala Mureintyp (Fiedler et al. 1971) ein deutlich anders aufgebautes Murein als das, das bei dem Cellulomonasstamm gefunden wurde.

Aus dem gleichen Grund ist auch die Forderung, von Bousfield (1972), *C. biazotea* in die Nähe von *Corynebacterium manihot* zu stellen, nicht gerechtfertigt. Von *Brevibacterium fermentans*, das sich ebenfalls in dieser Gruppe befindet, liegt keine Zellwandanalyse vor, so daß über die Berechtigung einer Zuordnung auf Grund dieses Merkmals nichts ausgesagt werden kann.

Die einzige Art, die aus der geschlossenen Gruppe der Cellulomonasstämmen etwas abgegliedert zu sein scheint, ist *C. cartalyticum*, dessen Mureintyp innerhalb der Gattung sonst nicht mehr vorgefunden wird. Auch die Mannigfaltigkeit der Substratverwertung, der ausgeprägte Formenwechsel und die Wiederverwertung gebildeter Säuren beweist die besondere Stellung von *C. cartalyticum*.

Der L-Lys-D-Ser-Asp-Typ des Mureins ist bei coryneformen Organismen bisher nur bei *Corynebacterium manihot* NCIB 9097 und *Brevibacterium liticum* ATCC15921 (Fiedler et al. 1971) gefunden worden. Aus eigenen Arbeiten (Stackebrandt, 1971) geht hervor, daß auch in Bezug auf den L-Lactatstoffwechsel zwischen diesen drei Arten Übereinstimmung besteht.

Angaben über das GC-Verhältnis liegen nur für *Corynebacterium manihot*, nicht jedoch für die anderen beiden Arten vor, so daß auch hinsichtlich dieses Merkmals keine Aussagen über eine mögliche Beziehung besteht. Seiler (1974) stellt noch *Corynebacterium aquaticum* ATCC 14665 in diese Gruppe. Dieser Stamm besitzt jedoch den völlig anderen Zellwandtyp [L-DAB]-D-Glu-D-DAB, (Schleifer und Kandler, 1972), sodaß diese Beziehung fraglich ist.

Die Ausgliederung von *C.cartalyticum* aus der Gattung *Cellulomonas* auf Grund des Zellwandtyps scheint nicht zwingend zu sein, denn durch das Vorkommen einer, bei allen coryneformen, celluloseverwertenden Stämmen gefundenen Dicarboxylaminosäure in der Interpeptidbrücke, ist durchaus eine Ähnlichkeit mit den übrigen Vertretern der Gattung gegeben. Auch in der Fähigkeit der Cellulosehydrolyse und in der Art der gebildeten Säuren stimmt *C.cartalyticum* mit den anderen Stämmen der Gattung überein, was unserer Meinung nach dazu berechtigt, diesen Stamm in der Gattung *Cellulomonas* zu belassen.

Hinsichtlich des Glucose-Stoffwechsels gleichen sich alle untersuchten *Cellulomonas*-stämmen. Der auf Grund von radiorespirometrischen Untersuchungen an fünf Arten ermittelte Abbauweg, ergab bei allen die Beteiligung des EMP- und des HMP-Weges. Da alle Stämme der Gattung die gleichen Säuren bilden, kann man schließen, daß auch die Stämme, von denen die Abbauewege nicht durch die oben genannte Methode untersucht wurden, doch auch die Glucose über diese Wege abbauen. Die Anwesenheit des EMP- und HMP-Weges wurde bisher bei allen, auf den Abbauweg hin untersuchten coryneformen Organismen gefunden (Giretti und Barron 1954, Morris 1960, Zagallo und Wang 1961, 1967).

Aerob sind die Hauptprodukte des Glucose-Abbaues CO_2 , Lactat und Acetat, wobei das gebildete L-Lactat von einigen Stämmen wieder verwertet werden kann, so daß es im Medium nicht mehr nachweisbar ist. CO_2 stammt sowohl aus der Carboxyl-Gruppe des Pyruvats, als auch aus dem Zitronensäurecyclus. Der bei oxydativen Vorgängen entstehende Wasserstoff wird sowohl über die Atmungskette transportiert, als auch, durch Reduktion von Zwischenverbindungen, unter Säurebildung beseitigt.

Unter anaeroben Bedingungen im Puffer werden neben Acetat und Lactat auch Formiat und Äthanol, und in geringerem Ausmaß, CO_2 und Succinat gebildet. CO_2 und Formiat entstehen hier fast ausschließlich aus den Positionen 3 und 4 der Glucose, wenn auch, durch die Anwesenheit des HMP-Weges, etwa 5 % CO_2 aus der Position 1 der Glucose gebildet werden. Vergleiche mit Angaben über die Säurebildung von anderen coryneformen Organismen können nicht gezogen werden, da, mit Ausnahme der Gärungsbilanzen von medizinisch wichtigen Corynebakterien, wie *C. diphtheriae* (Tasman und Branwijk, 1938) und *C. agne* (Moore and Cato, 1963), sowie von *Microbacterium lacticum* (Vandemark und Wood, 1956) weitere Angaben nicht vorliegen.

Alle untersuchten Stämme sind in der Lage, CO_2 unter Bildung von Succinat zu fixieren. Der Mechanismus der Fixierung wurde zwar nicht untersucht, es wird jedoch vermutet, daß es sich, wie bei *Arthrobacter suboxydans* und *Corynebacterium nephridii* (Grabbe, 1969) und bei *Corynebacterium agne* (Moore and Cato, 1963) um eine Bindung von CO_2 an Phosphoenolpyruvat oder Pyruvat handelt.

Die Entstehung des entgegen den Erwartungen bei Abbau der Glucose über die Glycolyse gebildeten Acetats aus den Positionen 3 und 4 der Glucose wurde unter 3.5.3.2. ausführlich diskutiert. Wie beschrieben ist für das Auftreten von Acetat aus den "falschen" Positionen kein zusätzlicher Abbauweg, sondern eine Umverteilung der Kohlenstoffatome vor dem Abbau der Glucose verantwortlich.

Die umgruppierenden Reaktionen fanden bei den untersuchten Stämmen in unterschiedlichem Ausmaß statt. Bei *C. subalbus* wurde bei der Vergärung von 3,4- ^{14}C -Glucose jedoch kein markiertes Acetat und nur Spuren von markiertem Äthanol gefunden. Die Untersuchung über die Markierungsverteilung

im Lactat zeigte aber, daß 6.3 % der Gesamtmarkierung im Lactat in Position 2 und 3 verteilt waren. Das bedeutet, daß auch bei *C. subalbus* in geringem Umfang eine Umverteilung der C-Atome stattfindet.

Eine Umverteilung müßte man überall dort erwarten, wo die Gluconeogenese und die Bildung von Polysacchariden stattfindet. Tatsächlich wurden starke symmetrische und asymmetrische Kohlenstoffverschiebungen hauptsächlich an Algen und höheren Pflanzen gefunden, bei denen im Laufe der Photosynthese Glucose und Reservopolysaccharide gebildet werden (Benson und Calvin, 1950; Bassham und Calvin, 1957; Gibbs und Kandler, 1957), sowie bei der Glycogenbildung in tierischen Geweben (Marks und Horecker, 1956; Landau und Katz, 1964).

Da die Umgruppierung der Kohlenstoffatome in den Hexosen vom jeweiligen Fließgleichgewicht der beteiligten Reaktionen abhängt, sind solche Umgruppierungen bei Organismen die vorwiegend Glucose abbauen, im wesentlich geringerem Ausmaß zu erwarten, als bei den Organismen, die auch Zucker in erheblichem Umfang aufbauen. Tatsächlich sind Umverteilungen bei Bakterien, die vorwiegend Glucose abbauen und nur in geringem Ausmaß Zucker synthetisieren, selten bekannt.

Da bei den energiegewinnenden Reaktionen das Fließgleichgewicht in Richtung Abbau der Glucose liegt, ist wenig Gelegenheit zur Resynthese von Triosen zu Hexosen gegeben. So ergab auch die Analyse der aus positionsmarkierten Glucosen entstehenden markierten Endprodukte in fast allen Untersuchungen, daß eine Umgruppierung nicht, oder zu nur wenigen Prozenten stattfindet. Als Beispiele dafür seien die Untersuchungen angeführt, in denen Abbauege von Bakterien analysiert wurden: *Bifidobakterien* (Scardovi, 1964), *Pseudomonaden* (Entner und Doudoroff, 1952), *Leuconostoc*

mesenteroides (Gunsalus und Gibbs, 1952) und *Clostridium thermoaceticum* (Barker und Kamen, 1945).

Ausnahmen von diesen Ergebnissen wurden nur in wenigen Fällen gefunden. So wurden Umgruppierungen von Kohlenstoffatomen in Hexosen bei dem Abbau von Fructose durch *Leuconostoc mesenteroides* (Busse et al. 1961) und bei der Shikimisäuresynthese aus Glucose durch *Escherichia coli* (Srinivasan et al. 1956) gefunden.

Diese wenigen Ausnahmen über umgruppierende Reaktionen in Hexosen machen die Sonderstellung ihres Auftretens innerhalb der Gattung *Cellulomonas* und ihre Bedeutung für eine Abgrenzung gegenüber den verwandten Gattungen besonders deutlich. Denn derartige Umverteilungen wurden weder früher bei *Arthrobacter atrocyaneus* und *Arthrobacter simplex* (Stackebrandt, 1971), noch bei den in dieser Arbeit untersuchten Stämme *Corynebacterium callunae* und *Microbacterium lacticum* gefunden.

Zusammenfassend kann man sagen, daß der Vergleich der hier untersuchten Differenzierungsmerkmale, wie die Fähigkeit der Cellulosehydrolyse, die Säurebildung, die Abbauewege für Glucose, der Mureintyp, der Umbau der Kohlenstoffatome in Hexosen und der GC-Gehalt der DNS (Yamada und Komagata, 1970) die Geschlossenheit der Gattung *Cellulomonas* demonstriert. Darin besteht auch die Berechtigung zur Aufrechterhaltung dieser Gattung.

V. Zusammenfassung

12 Stämme der Gattung *Cellulomonas* wurden hinsichtlich physiologischer und biochemischer Merkmale untersucht.

Eine Reihe von Merkmalskomplexen, wie Zellwandaufbau, GC-Verhältnis, Morphologie und Mechanismus des Glucoseabbaues sind so ähnlich, daß die Vereinigung dieser Stämme zu einer eigenen Gattung und die Trennung von den anderen coryneformen Gattungen berechtigt erscheint.

Andererseits ergeben sich hinreichend viele verschiedene Merkmalskombinationen, so daß folgende 7 Arten unterschieden werden können : *C.biazotea*, *C.cartalyticum*, *C.cellasea*, *C.fimi*, *C.flavigena*, *C.gelida* und *C.uda*.

Die Untersuchung der Abbauege der Glucose ergab als Hauptprodukte des aeroben Glucoseabbaues CO_2 , Formiat, Acetat und L-Lactat. Bei manchen L-lactatverwertenden Stämmen ist während des Wachstums kein L-Lactat nachweisbar.

Unter anaeroben Bedingungen werden durch ruhende Kulturen im Puffer aus Glucose vorwiegend Acetat, Äthanol und L-Lactat, in geringeren Mengen CO_2 , Formiat und Succinat gebildet. Das Verhältnis der Mengen von CO_2 und Formiat hängt vom pH-Wert ab. An der Bildung von Succinat ist die Fixierung von CO_2 aus der Atmosphäre beteiligt. Bei Verwendung von $^{14}\text{CO}_2$ fand sich die Markierung fast ausschließlich im Succinat.

An 5 Stämmen wurde der Abbauweg für Glucose mit Hilfe positionsmarkierter Glucosen untersucht. Sowohl die Radiorespirometrie, als auch die Markierungsverteilung auf die, bzw. innerhalb der Endprodukte zeigen, daß am Abbau der Glucose vorwiegend der EMDEN-MEYERHOF-WEG und, zu einem geringen Teil, der HEXOSE-MONOPHOSPHAT-WEG beteiligt sind.

In den 6 untersuchten Stämmen findet innerhalb der Glucose vor ihrem Abbau eine Umgruppierung der Kohlenstoffatome statt, wie aus der Markierungsverteilung in den aus positionsmarkierten Glucosen entstandenen Glucose-P hervorgeht. An der Umverteilung sind sowohl der EMP- und HMP-Weg, als auch die direkte Umwandlung durch die Transaldolase und die Transketolase beteiligt.

Die Umverteilung der Kohlenstoffatome vor dem endgültigen Abbau der Glucosen führt zum Auftreten von markierten Endprodukten bzw. zu Markierungsverteilungen in Endprodukten, die einem Abbau der Glucose über die Glycolyse zu widersprechen scheinen. Insbesondere wird aus 3- ^{14}C - und 3,4- ^{14}C -Glucose markiertes Acetat gebildet.

Das Zustandekommen der unerwartet auftretenden Markierungsverteilung durch eine De Novo Synthese von Acetat aus C_1 -Stücken, durch den von *Leuconostoc mesenteroides* und *Bifidobacterium bifidum* bekannten heterofermentativen Abbau oder durch den Entner-Doudoroff-Weg, konnte durch entsprechende Isotopenversuche und Untersuchung der Enzymausstattung ausgeschlossen werden.

VI. Literaturverzeichnis

- Altermatt, H.A. and A.C.Neish (1956). The biosynthesis of cell wall carbohydrates. III. Further studies on formation of cellulose and xylan from labeled monosaccharides in wheat plants.
Canad.J.Biochem.Physiol. 34, 405-414.
- Barker, H.A. and M.D.Kamen (1945). Carbon dioxid utilisation in the synthesis of acetic acid by *Clostridium thermoaceticum*.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 31, 219-225.
- Bassham, J.A. and M.Calvin (1957). "The path of carbon in photosynthesis". Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Beevers, H. (1956). Intermediates of the pentose phosphate pathway as respiratory substrates.
Plant Physiol. 31, 339-347.
- Benson, A.A., and M.Calvin (1950). Carbon dioxyd fixation by green plants.
Ann.Rev.Plant Physiol. 1, 25-42.
- Bergey, D.H., Breed, R., Hammer, R.W., Harrison, F-C. and F.M.Huntoon (1923). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ed. 1, Williams and Wilkens, Baltimore.

- Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmidt, F. und H.Stork (1970).
Bestimmung von Glucose mit Hexokinase und Glucose-
6-P-Dehydrogenase. In: Methoden der enzymatischen
Analyse, 1163-1168.
- Bousfield, I.J. (1972). A taxonomic study of some coryneform
bacteria.
J.Gen.Microbiol. 71, 441-455.
- Breed, R.S., Murray, E.G.D. and A.P.Hitchens (1948). Bergey's
Manual of Determinative Bacteriology, Ed.6,
Williams and Wilkins, Baltimore.
- Breed, R.S., Murray, E.G.D. and N.R.Smith (1957). Bergey's
Manual of Determinative Bacteriology, Ed.7, Williams
and Wilkins, Baltimore.
- Busse, M., Kindel, P.K. and M.Gibbs (1961). The heterolactic
fermentation. III. Position of C¹⁴ in the products
of fructose dissimilation by *Leuconostoc mesenteroides*.
J.biol.Chem. 236, 2850-2853.
- Clark, F.E. (1951). The generic classification of certain
cellulolytic bacteria. Proc.Sci.Soc.Amer.15,
180-182.
- Clark, F.E. (1952). The genera classification of the soil
coryneform bacteria. Bact.Nomencl. and Tax. 2,
45-56.
- Conn, J.(1947). A protest against the misuse of the generic
name *Corynebacterium*. J.Bact. 54, 10.
- Conn. J. and J.Dimmick (1947). Soil bacteria similar in
morphologie to *Mycobacterium* and *Corynebacterium*.
J.Bact. 54, 291-303.

- Cowan, S.T. (1950). Ideas for an outline classification of the Schizomycetes. 5th Int. Congr. Microbiology, Rio de Janeiro.
- Cowan, S.T. (1970). Are some characters more equal than others ? Bact. Nomencl. and Tax. 4, 541-550.
- Da Silva, G.A.N. and J.Holt (1965). Numerical taxonomy of certain coryneform bacteria. J.Bact. 90, 921-927.
- Davis, G.H.G. and K.G.Newton (1969). Numerical taxonomy of some named coryneform bacteria. J.gen.Microbiol. 56, 195-214.
- Deibel, R.H. and C.F.Niven jr.(1964). Pyruvat fermentation by *Streptococcus faecalis*. J.Bact. 88, 4.
- Dörfel, D.H. (1959). Proteine und ihre Bausteine. I. Aminosäuren. In: Linskens, H.F. Papierchromatographie in der Botanik, Springer-Verlag, Berlin, 2.Aufl., 164.
- Drews, G. (1968). Mikrobiologisches Praktikum für Naturwissenschaftler. Springer-Verlag, Berlin, 96-97.
- Entner, N. and M.Doudoroff (1951). Glucose and gluconic oxydation of *pseudomonas saccharophila*. J.biol.Chem. 196, 853-862.
- Fiedler, F., Schleifer, K.H., Interschick, E., Cziharz, B. and O.Kandler (1970). Mureintypes in *Arthrobacter*, *Brevibacteria*, *Corynebacteria* and *Microbacteria*. Publ.Fac.Sci.Univ.J.E.Purkyne Brno, 47, 111-122.

- Fiedler, F. und O.Kandler (1973). Die Mureintypen in der Gattung *Cellulomonas* Bergey et al. Arch.Mikrobiol. 89, 41-50.
- Fontaine, F.E., Peterson, W.H., McCoy, E., Johnson, M.J. and G.J.Ritter (1942). A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum* n.sp. J.Bact.43, 701-715.
- Fukin, G.M. and P.J.Vandemark (1952). Evidence for the TCA cycle in *Corynebacterium creatinovorans*. J.Bact., 64, 887-889.
- Ghiretti, F. and E.S.G. Barron (1954). Pathway of glucose oxydation in *Corynebacterium creatinovorans*. Biochim.biophys.Acta 15, 445.
- Gibbs, M.R, Damrose, F.A., Benett, M.R., Bubeck (1950). On the mechanism of bacterial fermentation of glucose to lactic acid studied with C^{14} -glucose. J.biol.Chem. 184, 545-549.
- Gibbs, M. and O.Kandler (1957). Asymmetric distribution of C^{14} in sugars formed during photosynthesis. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 43, 446-451.
- Grabbe, K. (1963). Isotopenstudien über die Kohlendioxyd-fixierung bei heterotrophen Organismen. Dissertation, Munchen.
- Gunsalus, I.C. and D.F.Niven, Jr.(1942). The effect of pH on the lactic acid fermentation. J.biol.Chem. 145, 131-136.
- Gunsalus, J.C. and M.Gibbs (1952). The heterolactic fermentation II. Position of C^{14} in the products of glucose dissimilation by *Leuconostoc mesenteroides*. J.biol.Chem. 194, 871-875.

- Hohorst, H.J. (1966). L-Lactatbestimmung in: Methoden der enzymatischen Analyse (H.U.Bergmeyer), Weinheim, 266-270.
- Hulanicka, D. (1960). The pentose cycle in *Corynebacterium diptheriae*. Acta biochim.Pol. 7, 449-457.
- Jensen, H.L. (1934). Studies on saprophytic mycobacteria and corynebacteria. Proc.Linnean Soc.N.S.W., 59, 1-61.
- Jensen, H.L. (1952). The coryneform bacteria. Ann.Rev.Microbiol. 6, 77-91.
- Jensen, H.L. (1966). Some introductory remarks on the coryneform bacteria. J.Appl.Bact. 29, 13-16.
- Kandler, O. und M.Gibbs (1959). Untersuchungen über den Einfluß der Photosynthese auf die Austauschvorgänge innerhalb des Hexosemoleküls. Z.Naturforschg., 14b, 8-13.
- Kellermann, K.F. and I.G.McBeth (1912). The fermentation of cellulose. Zentralbl.f.Bakt.Abt.II, 34, 485-494.
- Kellermann, F.K., McBeth, J.G., Scales, F.M. and N.R.Smith (1913). Identification and classification of cellulose-dissolving bacteria. Zentralbl.f.Bakt. Abt.II. 39, 502-522.
- Kemp, M.B. und J.R.Quayle (1967). Microbial growth on C₁-compounds. Uptake of ¹⁴C formaldehyde and ¹⁴C¹ formate by methan-grown *Pseudomonas methanica* and determination of the hexose labelling pattern after brief incubation with ¹⁴C methanol. Biochem.J. 102, 94-102.

- Kerstens, K. and J. De Ley (1968a). The occurrence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* 34, 388-392.
- Kerstens, K. and J. De Ley (1968b). An easy screening for the enzymes of the Entner-Doudoroff pathway. *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Sero.* 34, 393-408.
- Kisskalt, K. und E. Berend (1918). Untersuchungen über die Gruppe der Diphteroiden (Corynebakterien). *Zentralbl. f. Bakt. Abt. I*, 81, 444-447.
- Kornberg, H. L. (1958). The metabolism of C_2 compounds in micro-organism. *Biochem. J.* 68, 535-543.
- Koshland, D. E., Jr. and F. H. Westheimer (1950). Mechanism of alcoholic fermentation. The fermentation of glucose-1- C^{14} . *J. Am. Chem. Soc.* 72, 3383-3388.
- Krasilnikov, N. A. (1934). Die Entwicklungsgeschichte der Bodenmycobakterien. *Zentralbl. f. Bakt. Abt. II*, 9c, 428-434.
- Landau, B. R. and J. Katz (1964). A quantitative estimation of the pathways of glucose metabolism in rat adipose tissue in vitro. *J. biol. Chem.* 239, 697-704.
- Larson, D. M., Snetsinger, D. S. and D. E. Waibel (1971). Procedure for determination of D-amino acids. *Anal. Biochem.* 39, 395-401.
- Lehmann, K. B. und R. O. Neumann (1896). Bakteriologische Diagnostik. 1. Auflage, J. F. Lehmann, München.
- Lentz, K. and H. G. Wood (1955). Synthesis of acetate from formate and carbon dioxide by *Clostridium thermoaceticum*. *J. biol. Chem.* 215, 645-654.

- Ljungdahl, L. and H.G.Wood (1964). Incorporation of ^{14}C from carbon dioxide into sugar phosphates, carboxylic acids, and amino acids by *Clostridium thermoaceticum*. J.Bact. 89, 1055-1064.
- Ljungdahl, L., Irion, E. and H.G.Wood (1965). Total synthesis of acetat from CO_2 (I). Biochemistry 4, 1271-1380.
- Ljungdahl, L. and H.G.Wood (1969). Total synthesis of acetat from CO_2 by heterotrophic bacteria. Ann.Rev. Microbiol. 23, 515-538.
- Lochhead, A.G. (1940). Qualitative studies of soil micro-organism. III. Influence of plant growth on the character of bacterial flora. Can.J.Res., Sect.C, 18, 42-53.
- Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.L. and R.J.Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.biol.Chem. 193, 265-275.
- Man, J.C., Rogosa, M. and M.E.Sharpe (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. J.Appl.Bact. 23, 130-135.
- Marks, P.A. and B.L.Horecker (1956). Distribution of radioactive carbon dioxide incorporated into rat liver glycogen. J.biol.Chem. 218, 327-333.
- Mitscherlich (1850). Zusammensetzung der Pflanzenzellwand. Monatsber.d.K.Preuß.Akad.d.Wissenschaften zu Berlin, 1, 102-110.
- Moore, W.E.C. and E.P.Cato (1963). Validity of *Propionibacterium acnes* (Gilchrist) Douglas and Gunder Comb.Nov. J.Bact. 85, 870-874.

- Morris, J.G. (1960). Studies on the metabolism of *Arthrobacter globiformis*. J.Gen.Microbiol. 22, 564-582.
- Murray, E.G.D., Breed R.S. and W.H.Burkholder (1948). *Corynebacteriaceae*, in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ed 6, 381-411.
- Neish, A.C.(1952). Analytical methods for bacterial fermentations. National Research Council of Canada, 46-8-3, Saskatoon, 1-18.
- Omelianski, W. (1902). Über die Gärung der Zellulose. Zentralbl.f.Bakt.Abt.II, 8, 225-294.
- Orskov, J. (1938). Untersuchungen über Strahlenpilze, rein-gezüchtet aus dänischen Erdproben. Zentralbl.f.Bakt. Abt.II, 98, 344-357.
- Platt, R.B. and E.M.Foster (1957). Products of glucose metabolism by heterofermentative streptococci under anaerobic conditions. J.Bact.75, 453-459.
- Popoff, L. (1875). Über die Sumpfgasgärung. Pflügers Arch.f.Physiol. 10, 113-146.
- Rosé, J.A. (1955). Bestimmung von Acetat mit Acetatkinase und Hydroxylamin. in: Methoden der enzymatischen Analyse (H.U.Bergmeyer), 1970, 1486-1490.
- Scardovi, V. and L.D.Trovatelli (1965). The fructose-6-phosphate shunt as a peculiar pattern of the hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. Ann.Microbiol. 15, 19-29.

- Schleifer, K.H. und O.Kandler (1967). Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken. I. Zur Aminosäuresequenz des Mureins von *Str.thermophilus* und *Str.faecalis*. Arch.Mikrobiol. 57, 335-365.
- Schleifer, K.H. and O.Kandler (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bact.Rev.36, 407-476.
- Schramm, M., Klybas V. and E.Racker (1958). Phosphorolytic cleavage of fructose-6-P by fructose-6-P phospho-ketolase from *Acetobacter xylinum*. J.biol.Chem. 233, 1283-1288.
- Schulman, M., Parker D., Ljungdahl L. and H.G.Wood (1972). Total synthesis of acetat from CO₂. V. Determination by mass analysis of the different types of acetat formed from ¹³CO₂ by heterotrophic bacteria. J.Bact.109, 633-644.
- Schulman, M., Ghambeer R.K., Ljungdahl, L. and G.H.Wood (1973). Total synthesis of acetat from CO₂. VII. Evidence with *Clostridium thermoaceticum* that the carboxyl of acetat is derived from the carboxyl of pyruvat by transcarboxylation and not by fixation of CO₂. J.biol.Chem. 248, 6255-6261.
- Schweppe, H. (1954). Dissertation, Münster, in: Linskens, H.F. (1959). Papierchromatographie in der Botanik, Springer-Verlag, Berlin, 2.Aufl., 120.
- Seiler, H. (1974). Taxonomische Untersuchungen an grampositiven Keimen des Abwassers. Zentralbl.f.Bakt.Hyg.Abt.I., in Vorbereitung.
- Simon, H. und H.G.Floss (1967). Bestimmung der Isotopenverteilung in markierten Verbindungen. Band 1, Springer-Verlag, Berlin.

- Srinivasan, P.R., Shigeura H.T., Sprecher M., Sprinson D.B. and B.D.Davis (1956). Biosynthesis of shikimic acid. *J.biol.Chem.*220, 477-490.
- Stackebrandt, E. (1971). Untersuchungen über den Lactatstoffwechsel und Bestimmung der Abbauewege für Glucose und Gluconat bei *Corynebacterien*. Diplomarbeit, München.
- Stuart, H.R. and P.E.Pease (1972). A numerical study on the relationships of *Listeria* and *Erysipelothrix*. *J.Gen.Microbiol.* 73, 551-565.
- Tasman, A. and A.C.Branwijk (1938). Experiments on metabolism with *diphthteria bacillus*. *J.Infec.Dis.*, 63, 10-20.
- Tikka, J. (1935). Über den Mechanismus der Glucosevergärung durch *E.coli*. *Biochem.Z.*, 279, 264-288.
- Trevelyan, W.E., Procter D.D. and J.S.Harrison (1950). Detection of sugars on paperchromatograms. *Nature* 166, 444-445.
- Vandemark, P.J. and W.A.Wood (1956). The pathways of glucose dissimilation by *Microbacterium lacticum*. *J.Bact.* 71, 385-392.
- Van Iterson, Jr.C. (1904). Die Zersetzung von Zellulose durch aerobe Mikroorganismen. *Zentralbl.f.Bakt.Abt.II*, 11, 689-698.
- Varner, J.E. (1957). Chromatographic analyses of organic acids: In: *Methods of Enzymology III*, 397-402.
- Veldkamp, H.(1970). Saprophytic coryneform bacteria. *Ann.Rev.Microbiol.*24, 209-240.

- Wang, C.H., Stern I., Gilmour C.M., Klungsoyr S., Reed D.J., Bialy J.J., Christensen B.E. and V.H.Cheldelin (1958). Comparative study of glucose catabolism by the radiorespirometric method. J.Bact. 76, 207-216.
- Wang, C.H. and J.K.Krackov (1962). The catabolic fate of glucose in *Bacillus subtilis*. J.biol.Chem. 237, 3614-3622.
- Wieland, T. und C.Fischer (1949). Papierchromatographie von α -Ketosauren. Naturwissenschaften 36, 219.
- Wieringa, K.T. (1936). Over het verdwijnen van waterstof en koolzuur onder anaerobe voorwaarden. *Antonie van Leeuwenhock, J.Microbiol.Serol.*, 3, 263-273.
- Wiesenberg, E. (1948). Die mikroanalytische Bestimmung von C-Methyl- und Acetylgruppen. *Mikrochemie* 33, 51.
- Wood, H.G. (1952). A study of carbon dioxide fixation by mass determination of the types of ^{13}C -acetate. J.biol.Chem. 194, 905-931.
- Wood, H.G., Gillespie, R., Joffe S., Hansen R.G. and H.Hardenbrook (1958). Lactose synthesis (V). J.biol.Chem. 233, 1271-1278.
- Wood, H.G. and J.Katz (1958). The distribution of ^{14}C in the hexose phosphates and the effect of recycling in the pentose cycle. J.biol.Chem. 233, 1279-1282.
- Yamada, K. and K.Komagata (1970). Taxonomic studies on coryneform bacteria. III. DNA base composition of coryneform bacteria. J.Gen Appl.Microbiol. 16, 215-224.

- Yamada, K. and K.Komagata (1972 a). Taxonomic studies on coryneform bacteria. IV. Morphological, cultural, biochemical and physiological characteristics. J.Gen.Appl.Microbiol. 18, 399-416.
- Yamada, K. and K.Komagata (1972 b). Taxonomic studies on coryneform bacteria. V. Classification of coryneform bacteria. J.Gen.Appl.Microbiol. 18, 417-431.
- Zagallo, A.C. and C.H.Wang (1961). Comparative carbohydrate catabolism in Arthrobacter. J.gen.Microbiol. 29, 389-401.
- Zagallo, A.C. and C.H.Wang (1967). Comparative carbohydrate catabolism in Corynebacteria. J.gen.Microbiol. 47, 347-357.
- Zajik, J.E., J.De Ley and M.P.Starr (1956). Oxydative metabolism of Corynebacterium insidiosum. Bact.Proc. 116.

Die vorgelegte Arbeit wurde am Institut für
Allgemeine Botanik der Ludwig-Maximilians-
Universität München unter der Leitung von
Prof.Dr.O.Kandler von 1971 bis 1974 angefertigt.

Herrn Prof. Kandler danke ich für die Anteilnahme
an meiner Arbeit und für alle Unterstützung und
wertvollen Hinweise.

Mein Dank gilt auch den kollegialen Mitarbeitern
am Botanischen Institut.

Frau L. Hagner danke ich für ihre sorgfältige
Assistenz.

Lebenslauf

Am 9. Juni 1944 wurde ich, Erko Stackebrandt, als Sohn des HNO-Arztes Dr. Herbert Stackebrandt und seiner Ehefrau Lore, geb. Hiepe, in Hamburg geboren.

Von 1950 bis 1955 besuchte ich in Hamburg die Volksschule und anschließend, von 1955 bis 1965, das Albert-Schweitzer Gymnasium. Im Februar 1965 legte ich die Reifeprüfung ab.

Von April 1965 bis Oktober 1966 leistete ich meinen Wehrdienst beim Bundesgrenzschutz in Lübeck ab.

Vom Wintersemester 1966/67 an studierte ich Biologie an der Ludwig-Maximilians Universität München und legte hier im Wintersemester 1971/72 die Hauptprüfung für Diplombiologen ab.

Im November 1971 begann ich unter der Anleitung von Prof.Dr.O.Kandler mit der Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit.

Von Juni 1971 bis August 1972 war ich Zeitangestellter bei der Gesellschaft für Strahlenforschung mbH, München. Danach übernahm ich für 7 Monate die Stelle eines wissenschaftlichen Angestellten an der Universität München. Seit April 1973 bin ich wissenschaftlicher Angestellter bei der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, München, Bereich: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen.

Seit November 1971 bin ich mit der Diplom-Soziologin Jutta Stackebrandt geb. Krone verheiratet.

in the first half of the year 1919, the number of cases of influenza was 1,200, and the number of deaths 100. In the second half of the year, the number of cases was 1,500, and the number of deaths 120. The total number of cases for the year was 2,700, and the total number of deaths was 220. The number of cases of influenza was 1,200 in the first half of the year, and 1,500 in the second half. The number of deaths was 100 in the first half, and 120 in the second half. The total number of cases for the year was 2,700, and the total number of deaths was 220. The number of cases of influenza was 1,200 in the first half of the year, and 1,500 in the second half. The number of deaths was 100 in the first half, and 120 in the second half. The total number of cases for the year was 2,700, and the total number of deaths was 220.

The number of cases of influenza was 1,200 in the first half of the year, and 1,500 in the second half. The number of deaths was 100 in the first half, and 120 in the second half. The total number of cases for the year was 2,700, and the total number of deaths was 220.

The number of cases of influenza was 1,200 in the first half of the year, and 1,500 in the second half. The number of deaths was 100 in the first half, and 120 in the second half. The total number of cases for the year was 2,700, and the total number of deaths was 220.

The number of cases of influenza was 1,200 in the first half of the year, and 1,500 in the second half. The number of deaths was 100 in the first half, and 120 in the second half. The total number of cases for the year was 2,700, and the total number of deaths was 220.



